



EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA DISMINUIR LOS NIVELES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Comparación de tres sistemas de procesamiento de muestras de
semen

Alumna: Cuesta, Carolina

Tutor: Dr. Martinez, A. Gustavo

Año: 2021

Universidad de Belgrano: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera: Licenciatura en Ciencias Biológicas

Firma:

RESUMEN

Es sabido que el ADN espermático compone la mitad de la carga genética embrionaria. La fragmentación de ese ADN es la principal causa molecular de la infertilidad masculina. Pese a que, en las últimas dos décadas se ha profundizado el estudio de este factor, se continúan utilizando técnicas rutinarias en el laboratorio de andrología que poco amparan la integridad genómica para el tratamiento de muestras de semen.

Las técnicas de separación y selección espermática más empleadas para realizar tratamientos de fecundación asistida son el swim-up y el gradiente de densidad. Las mismas discriminan los espermatozoides según su movilidad y morfología además de separarlos de los componentes del plasma seminal que pueden causarles estrés oxidativo y así dañar la integridad genómica, de modo que, el nivel de fragmentación del ADN espermático post procesamiento se reduce a un umbral aceptable para su utilización. Sin embargo, las etapas de centrifugación pueden inducir la fragmentación del ADN espermático, alterando dichos parámetros seminales. Por ello, los pacientes diagnosticados con aumento de la fragmentación del ADN espermático deben recurrir a métodos naturales o técnicas de selección diferentes para reducirlo como los dispositivos microfluídicos diseñados para seleccionar espermatozoides altamente móviles, morfológicamente normales y con mayor integridad del ADN.

Debido a que se trata de técnicas con distinto enfoque, en la presente tesis se comparó el grado de fragmentación del ADN espermático y demás parámetros seminales obtenidos al procesar muestras mediante swim-up, gradiente de densidad y un dispositivo microfluídico. La eficacia de cada metodología se vio reflejada en los resultados de los experimentos, siendo el dispositivo microfluídico el que alcanza reducir la fragmentación del ADN espermático a niveles cercanos a 0%.

Los resultados obtenidos en el trabajo sustentan las evidencias de trabajos previos y son relevantes para la comunidad científica y clínica dado su aplicación a las técnicas de reproducción asistida tanto de baja como de alta complejidad. Dichos resultados otorgan consistencia al proceso de validación del dispositivo microfluídico como instrumento global para ser aplicable en la práctica habitual de trabajo.

PALABRAS CLAVES

Fragmentación del ADN espermático, estrés oxidativo, selección espermática, swim-up, gradiente de densidad, dispositivo microfluídico.

ABSTRACT

It's known that sperm DNA makes up half of the embryonic genetic makeup. The fragmentation of that DNA is the main molecular cause of male infertility. Despite the fact that in the last two decades the study of this factor has been deepened, routine techniques continue to be used in the andrology laboratory that don't protect genomic integrity for the treatment of semen samples.

Swim-up and density gradient are the most frequent techniques of sperm separation and selection used for assisted fertilization treatments. These techniques discriminate sperm according to their mobility and morphology in addition to separating them from seminal plasma components that can cause oxidative stress and thus damage genomic integrity, in addition, post-processing sperm DNA fragmentation level is reduced to an acceptable threshold for their use. However, the centrifugation steps can cause sperm DNA fragmentation, altering these seminal parameters. Therefore, patients diagnosed with increased sperm DNA fragmentation must resort to natural methods or different selection techniques to reduce it.

Among the new techniques, microfluidic devices are designed to select highly mobile sperm, morphologically normal and with higher DNA integrity. Because swim-up, density gradient and a microfluidic device have different approaches, it was compared the degree of sperm DNA fragmentation and other seminal parameters in samples processed with each one of them. The effectiveness of each methodology was reflected in the experiments results, being the microfluidic device the one that manages to reduce the DNA sperm fragmentation to levels close to 0%.

The results obtained in this work support the evidence from previous works and are relevant for the scientific and clinical community by their application to low and high complexity assisted reproduction techniques. These results provide consistency to the validation process of the microfluidic device as a global instrument to be applicable in usual work practice.

KEY WORDS

Sperm DNA fragmentation, oxidative stress, sperm selection, swim-up, density gradient, microfluidic device.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia en primer lugar por el apoyo incondicional durante todo el recorrido académico, a la Universidad de Belgrano, sus prestigiosos profesores y directora de la Carrera de Ciencias Biológicas por forjar mi formación profesional y dotarme de valores éticos y humanos para ejercer en el futuro como bióloga. A la clínica de reproducción asistida Fertilidad San Isidro por marcar mis primeros pasos en el inicio de la rama de biología reproductiva y adentrarme en los primeros saberes. Expreso gratitud especialmente a mi tutor, el Dr. Gustavo A. Martinez, quien me guió y acompañó en todo momento durante la realización de la tesis, compartiendo sus conocimientos para lograr la mejor versión de ella. Por último, mi reconocimiento a la clínica de reproducción asistida Medicina Reproductiva Fertilis, que me dió la posibilidad de compartir su espacio para la realización del presente trabajo final de carrera.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
ANÁLISIS DEL SEMEN - EL ESPERMOGRAMA	6
EL FACTOR MASCULINO	7
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	8
CAUSAS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	9
ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	10
TRATAMIENTO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	11
MARCO TEÓRICO	14
RAZONES FÍSICAS	14
INFECCIONES DEL TRACTO GENITAL MASCULINO	14
PROBLEMAS SEXUALES	15
DEFECTOS HORMONALES	15
ESTILO DE VIDA Y CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	15
EPIGENÉTICA	16
ESTRÉS OXIDATIVO	16
DEFECTOS GENÉTICOS	17
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	17
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
HIPÓTESIS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
LISTADO DE EQUIPOS, MATERIAL DESCARTABLE, REACTIVOS Y MEDIOS	
EMPLEADOS	25
METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA REALIZAR EL ESPERMOGRAMA CON ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN	27
TÉCNICA DE SWIM-UP	27
TÉCNICA DE SEPARACIÓN POR GRADIENTE DE DENSIDAD	27
TÉCNICA DE SISTEMA MICROFLUÍDICO	28
TÉCNICA DE TUNEL	28

EXPERIMENTO 1: COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO LUEGO DEL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SEMEN MEDIANTE GRADIENTE O SWIM-UP	31
EXPERIMENTO 2: COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO LUEGO DEL PROCESAMIENTO DE SEMEN MEDIANTE SWIM-UP O UN SISTEMA MICROFLUÍDICO	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
RESULTADOS	35
EXPERIMENTO 1: GRADIENTE VS SWIM-UP	35
EXPERIMENTO 2 : SWIM-UP VS. DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO	36
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	43
BIBLIOGRAFÍA	44
APÉNDICE	51

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la infertilidad como “una enfermedad del sistema reproductivo determinada por la imposibilidad de lograr un embarazo luego de al menos 12 meses de coitos regulares no protegidos” (OMS, 2010). No obstante, la infertilidad es una condición tratable dentro del área de la salud reproductiva.

Actualmente, según las últimas estadísticas de la OMS, se estima que alrededor de 50-80 millones de personas en todo el mundo padecen esta condición y las causas masculinas son responsables de aproximadamente el 20-30% de todos los casos (Babakhanzadeh et al., 2020). Por lo tanto, evaluar la infertilidad masculina es no sólo necesario, sino también de gran importancia para guiar a las parejas sobre sus opciones de tratamiento y aumentar las posibilidades de lograr un embarazo. En términos clínicos, la infertilidad masculina es definida por dicho Organismo como cualquier trastorno del aparato reproductivo masculino caracterizado por disfunción de la emisión de semen o ausencia anormal de nivel mensurable de espermatozoides en el semen. En otras palabras, ocurre cuando hay una disminución en la cantidad y calidad de los espermatozoides.

Una de las etapas que influye fuertemente en la fertilidad masculina es la espermatogénesis, proceso mediante el cual se forman los espermatozoides. Este proceso inicia en la adolescencia y perdura durante toda la vida del hombre. Se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de las gónadas y tiene una duración aproximada de entre 62 a 75 días (Carlson, 2019, p.479). Una mínima desviación de su curso natural puede provocar infertilidad en el hombre (Agarwal et al., 2021). La especialidad médica que se aboca al estudio y tratamiento de la infertilidad y de las disfunciones sexuales en el varón es la andrología, mediante la realización de un análisis de semen: el espermograma (Zambrano Serrano y Carvajal Obando, 2020). Si dicho análisis presenta parámetros seminales alterados se asocia con poca eficiencia para fecundar los ovocitos.

ANÁLISIS DEL SEMEN – EL ESPERMOGRAMA

El análisis de semen sirve como un marcador de referencia de la fecundidad masculina con datos sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides (Bieniek et al., 2016). Por ello, dicho análisis es y será el factor más importante en la exploración inicial del potencial de fertilidad masculina. Los parámetros más importantes del espermograma son la concentración, movilidad y morfología espermática. Además, otro parámetro analizado con menor frecuencia en los laboratorios de andrología es la fragmentación del ADN espermático. En años recientes ha cobrado importancia el estudio de este último factor, debido a la correlación con los problemas

de fertilidad recientemente descritos (Esteves et al., 2021). Cuando alguno de los parámetros de la muestra de semen se encuentra alterado, se considera que el problema de fertilidad de la pareja es por un factor masculino.

EL FACTOR MASCULINO

Desde el punto de vista clínico se habla de factor masculino cuando se determina que la causa de infertilidad está originada en el varón, luego de llevarse a cabo su evaluación clínica. Este factor es multicausal y su determinación incluye la realización de un análisis de semen (Fig. 1).

Es frecuente encontrar en el hombre defectos en la espermatogénesis asociados a alteraciones genéticas y/o metabólicas. Las alteraciones genéticas son de difícil tratamiento, mientras que, las alteraciones metabólicas muchas veces pueden ser tratadas con medicamentos (Casarini et al., 2020). Estos defectos se encuentran presentes en la mayoría de los hombres en los que se diagnostica algún factor masculino que puede incluir una baja concentración espermática u oligozoospermia, una pobre movilidad de sus espermatozoides o astenozoospermia y/o un aumento de la morfología anormal de los mismos o teratozoospermia (Softness et al., 2020).

La exposición a factores medioambientales y hábitos de consumo pueden impactar negativamente en la fertilidad masculina, lo cual suele ser común en hombres diagnosticados con infertilidad de causa desconocida habitualmente denominada infertilidad idiopática (Gallo et al., 2020; Kamiński et al., 2020). También, se postula que hay modificaciones epigenéticas que ocurren durante el desarrollo de la célula germinal que juegan un rol en la expresión génica, la meiosis, la integridad del genoma y el “imprinting” genómico que pueden derivar en alteraciones de la calidad seminal (Cescon et al., 2020). Por otra parte, se ha demostrado que el estrés oxidativo produce alteraciones en los parámetros seminales (Aitken, 2020; Chianese y Pierantoni, 2021).

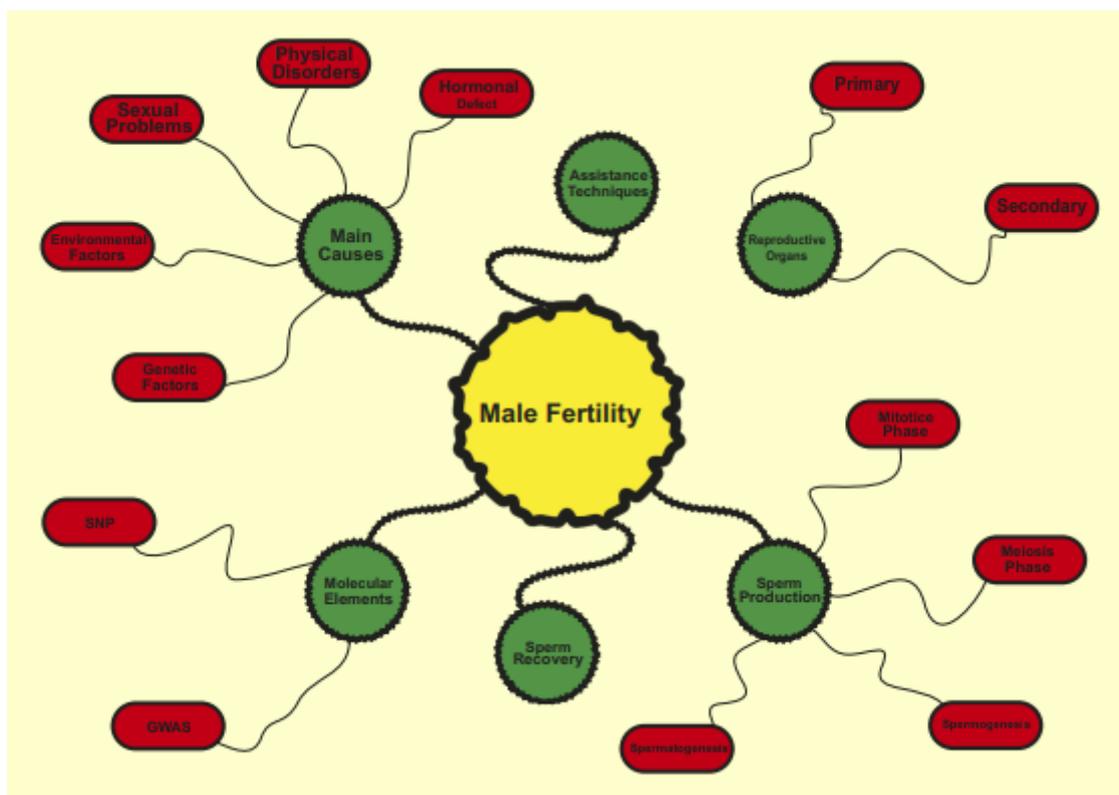


Fig. 1. Causas que afectan el factor masculino (Babakhanzadeh et al., 2020).

Muchas causas, tanto intrínsecas como extrínsecas, impactan en la integridad del ADN espermático llegando a provocar estrés oxidativo y apoptosis (Marzano et al., 2019). Inclusive, actualmente se considera a la fragmentación del ADN espermático como la principal causa molecular de infertilidad masculina (Esteves et al., 2021).

FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Como se dijo anteriormente, en años recientes diferentes grupos de investigación han encontrado un correlato entre el daño del ADN espermático y problemas de fertilidad en el varón. Este daño lo experimentan las células germinales durante la espermatogénesis tardía debido a una disfunción del sistema de reparación del ADN. Se ha demostrado que la fragmentación del ADN puede ocurrir tanto en una como en las dos cadenas del ADN (Agarwal et al., 2019).

La fragmentación del ADN produce un daño subletal en el espermatozoide permitiendo que este mantenga su funcionalidad, inclusive su capacidad de fecundar el ovocito, pero provocando un efecto no deseado en las etapas posteriores a la fecundación (Qiu et al., 2020). Este efecto tardío se hará evidente a lo largo del desarrollo del embrión preimplantacional,

principalmente, al observar una mala calidad embrionaria, como también más adelante, al provocar fallas de implantación, una pérdida temprana del embarazo entre las semanas 7 y 10 de gestación y defectos congénitos en la descendencia (Cissen et al., 2026).

Debido a que el espermatozoide aporta el 50% de la carga genética del embrión, ha cobrado importancia el estudio de la fragmentación del ADN espermático como enfoque para abordar los problemas de fertilidad, que en muchos casos imposibilita tanto la concepción natural como la asistida. Pese a ello, no existe un consenso para fijar un valor de corte que determine el umbral de fragmentación del ADN espermático para considerarse un semen afectado por ella. Algunos autores consideran que un valor del 20% sería el valor de corte (Agarwal et al., 2016; Van Montfoort et al., 2004; Zini et al., 2008) mientras que otros consideran dicho umbral en 30% (Colaco y Sakkas, 2018). Estos valores de corte dependen de la técnica aplicada para el estudio de la fragmentación del ADN espermático (Sakkas y Alvarez, 2010).

CAUSAS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

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

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

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad la fragmentación del ADN espermático es la principal causa molecular de la infertilidad masculina y tiene un efecto negativo en los resultados reproductivos de las parejas (Agarwal et al., 2019). Hasta la fecha, diversos estudios realizados han encontrado una estrecha asociación entre este parámetro seminal y la disminución de las tasas de fecundación, el fracaso de implantación y el desarrollo anormal del embrión (Gode et al., 2020). Los mismos concluyeron que al aumentar el grado de fragmentación del ADN espermático, provocan la disminución de los resultados de los

tratamientos de FIV e ICSI (Agarwal et al., 2019; Martínez et al., 2020; Miller et al., 2020). Sin embargo, aún las causas y efectos de los daños provocados en el ADN de los espermatozoides continúa en investigación.

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

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

ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Las técnicas existentes para estudiar la fragmentación del ADN espermático se pueden dividir en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos: Sperm Chromatin Structure Assay o SCSA (Evenson et al., 1999) y Sperm Chromatin Dispersion o SCD (Fernández et al., 2003). En el segundo grupo se incluyen las técnicas que marcan específicamente las lesiones en la cadena de ADN mediante la incorporación de moléculas marcadas con fluorocromos, éstas son: Ensayo cometa (Singh et al., 1988) y TUNEL o Terminal deoxyribonucleotidyltransferase-mediated Uridine 5-triphosphate-biotin Nick-End Labeling Assay (Lopes et al., 1998).

La técnica de Tunel ha mostrado una alta correlación entre los resultados del estudio y las tasas de embarazo logradas por fecundación *in vitro*, lo cual le confiere un alto valor predictivo (Alvarez y Lewis, 2008; Borini et al., 2006; Greco et al., 2005). Este ensayo ha mostrado ser altamente confiable para identificar las lesiones de ADN de cadena simple y doble en los espermatozoides de muestras de semen, particularmente, cuantificando la cantidad de roturas mediante fluorescencia de nucleótidos marcados que se unen a estas. Debido a su procedimiento rápido, sencillo y que su protocolo está estandarizado, esta técnica es de las más utilizadas a nivel mundial en los laboratorios de andrología para la medición de la fragmentación del ADN espermático (Agarwal et al., 2019). Hay trabajos que han mostrado resultados significativamente mayores en la disminuciones en la tasa de embarazo e

incremento en la tasa de abortos espontáneos cuando se detectan por Tunnel altos niveles de fragmentación en el material genético de los espermatozoides, en comparación a los resultados no significativos obtenidos mediante otras técnicas (Dominguez et al., 2007; Muratori et al., 2008).

TRATAMIENTO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

En algunos casos, el ovocito puede reparar naturalmente el daño del ADN del espermatozoide que lo fecunda. Esto depende del tipo de lesión del ADN, el porcentaje de ADN afectado y de la calidad del ovocito; un factor generalmente ligado a la edad de la paciente (Colaco y Sakas, 2018). Pese a ello, la opción más apropiada en un tratamiento de fecundación asistida es contar con espermatozoides cuyo ADN presente un alto nivel de integridad. En la actualidad no se cuenta con una técnica que repare dicho ADN y solo existen estrategias para reducir el nivel de fragmentación del ADN espermático de una muestra que, si se aplican en los tratamientos de reproducción asistida, pueden mejorar los resultados (Fainberg y Kashanian, 2019).

Estas estrategias pueden dividirse en dos grupos: aquellas que buscan mejorar el resultado de espermatogénesis y las que actúan sobre la muestra seminal con el objetivo de eliminar los espermatozoides con el ADN fragmentado. En el primer grupo podemos mencionar a las terapias con antioxidante orales (vitaminas c y e, zinc y selenio), cambios en el estilo de vida del varón tales como dejar de fumar, evitar el consumo de alimentos con alto contenido graso, el alcohol y las drogas, aumentar el nivel de actividad física, tratar las infecciones e inflamación del tracto genital masculino, sin dejar de mencionar las cirugías de varicocele (Fainberg y Kashanian, 2019; Yao y Mills, 2016). En el segundo grupo se encuentran la estrategia de acortar la abstinencia eyaculatoria, la biopsia testicular y la aplicación de técnicas de selección espermática en el laboratorio (Kim, 2018; Esteves et al., 2020).

Existe una variedad de técnicas de laboratorio que pueden ser aplicadas para eliminar a los espermatozoides con ADN fragmentado que han mostrado diferente grado de éxito, las cuales han sido descritas por diversos autores. Entre ellas las más empleadas son: swim-up, gradientes de densidad y separación magnética por columnas de Anexina-V (Boomsma et al., 2019; Henkel, 2012; Vaughan y Sakkas, 2019). Recientemente ha sido desarrollado un sistema de selección mediante una membrana microfluídica, la cual simula en un medio artificial el proceso del pasaje del espermatozoide por el tracto reproductor femenino (Parrella et al., 2019). A continuación se describen los cuatro métodos.

- a) Swim-up: Para esta técnica, la concentración y principalmente la motilidad espermática es un requisito esencial, ya que se basa en la capacidad de movimiento de los espermatozoides para migrar desde el líquido seminal hacia el medio cultivo. Se realiza

colocando medio de cultivo en un tubo y por debajo de la solución la muestra de semen. Durante el tiempo de incubación, los espermatozoides móviles nadan a través del medio y así se separan del resto de los componentes del plasma seminal.

- b) Gradiente de densidad: Estos gradientes separan los espermatozoides en función de su punto isopícnico, es decir, dividen las partículas en función de su densidad de flotación. Los diferentes componentes se separan hasta alcanzar una posición en la que su densidad es igual a la de su entorno (flotabilidad neutra), donde ya no se desplaza más. Los espermatozoides maduros son células compactadas y alcanzan el gradiente de mayor densidad ubicado en el fondo del tubo. Contrariamente, el plasma seminal permanece flotando sobre el gradiente de menor densidad y las otras células junto a los espermatozoides inmaduros y muertos se sitúan en la interfase entre los dos gradientes.

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

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

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

- d) Sistemas microfluídicos: A partir del avance tecnológico, hoy se dispone para los casos donde la fragmentación del ADN espermático está aumentada, herramientas diseñadas por equipos interdisciplinarios de ingenieros, médicos, biólogos, químicos, fisiólogos, etc. Estas herramientas son los dispositivos microfluídicos, también conocidos como

lab-on-a-chip. La microfluídica como ciencia, se ocupa de la manipulación precisa de pequeñas cantidades de fluidos, lo cual normalmente se realiza en microcanales o microporos con dimensiones de unos pocos cientos de micrómetros que funcionan como barreras de selección (Samuel et al., 2018). La ventaja de estas barreras es que sus dimensiones se encuentran en el mismo orden que las de muchas partículas biológicas (1–100 μm). Por lo tanto, cada vez crece más su uso dentro del campo médico e incluso se han hecho adaptaciones en el área de los tratamientos de reproducción asistida para la selección de espermatozoides.

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

Cuando se compara las técnicas convencionales de selección espermática con la tecnología emergente, esta última puede mejorar la recuperación de espermatozoides móviles de muestras de semen heterogéneas, seleccionando subpoblaciones que posean mayor capacidad fecundante, ya que imita más de cerca los procesos de selección natural y evita algunos de los elementos más perjudiciales de dichas técnicas convencionales (Samuel et al., 2018). Si bien algunos estudios han arrojado resultados prometedores con esta nueva tecnología, sigue siendo un campo en desarrollo que requiere de más investigación para aportar al conocimiento actual y comprobar su eficacia tanto en el tratamiento de la infertilidad masculina como en los tratamientos de reproducción asistida.

Con el objetivo de aumentar el conocimiento sobre los tratamientos para disminuir la fragmentación del ADN espermático, la presente tesis analiza tres metodologías de selección espermática, a través de la comparación estadística de los datos previos y posteriores a cada procedimiento, siendo el grado de fragmentación del ADN espermático el parámetro crucial para determinar con cuál metodología se obtiene la mejor calidad de muestra seminal a ser aplicada en el tratamiento de fertilidad: inseminación artificial y fecundación in vitro.

MARCO TEÓRICO

La infertilidad afecta a más de 50 millones de parejas en todo el mundo, implicando problemas sociales, psicológicos y económicos. En aproximadamente el 30% de ellas, la causa de la infertilidad está asociada al varón, lo que se define como factor masculino (Marzano et al., 2019). Cuando se está frente a un factor masculino, casi siempre se observará una alteración cuantitativa y/o cualitativa de uno o más parámetros seminales (Babakhanzadeh et al., 2020).

Una variedad de condiciones provoca infertilidad masculina. Algunas de ellas se pueden identificar y tratar, como el hipogonadismo hipogonadotrófico; otras se logran diagnosticar, pero no cuentan con un tratamiento específico, como alteraciones genéticas o atrofia testicular. Las diversas causas que provocan el factor masculino, se pueden agrupar en: razones físicas, infecciones del tracto genital masculino, problemas sexuales, defectos hormonales, estilo de vida y contaminación ambiental, epigenética, estrés oxidativo, defectos genéticos y la fragmentación del ADN espermático, siendo esta última la que ha cobrado recientemente gran importancia en el enfoque de la infertilidad masculina (Agarwal et al., 2021). A continuación se describen las causas mencionadas.

RAZONES FÍSICAS

Se corresponde a problemas de disfunción eyaculatoria con todas sus variantes. Los problemas físicos pueden interrumpir la producción de espermatozoides y/o bloquear la vía eyaculatoria. El agrandamiento de los vasos sanguíneos testiculares, conocido como varicocele, es una de las causas de infertilidad masculina más comunes. También la torsión testicular puede causar daño en los testículos debido a la presión sobre sus vasos sanguíneos y al deterioro de la circulación. Otro factor presente en el 2% de los episodios de infertilidad masculina, es la eyaculación retrógrada, por la cual el semen se eyacula en la vejiga debido a problemas anatómicos del esfínter de la misma (Babakhanzadeh et al., 2020).

INFECCIONES DEL TRACTO GENITAL MASCULINO

Tanto la infección viral que provoca las paperas así como las infecciones crónicas y agudas del tracto genital masculino pueden provocar infertilidad. Este es el mismo caso de las enfermedades de transmisión sexual como gonorrea y clamidia, que pueden provocar infertilidad en los hombres debido a la obstrucción del epidídimo (Bono y Reygaert, 2020).

PROBLEMAS SEXUALES

Los problemas sexuales representan un porcentaje importante entre los diversos factores masculinos. Muchos problemas sexuales son tanto físicos como psicológicos. La disfunción eréctil, conocida como impotencia, eyaculación precoz e incapacidad para eyacular son ejemplos frecuentes de problemas sexuales (Babakhanzadeh et al., 2020).

DEFECTOS HORMONALES

Alteraciones en el metabolismo hormonal puede provocar problemas de fertilidad en el varón. El eje de las hormonas reproductivas masculinas tiene tres componentes: el hipotálamo, la hipófisis y los testículos. Este eje trabaja con mucha regularidad para proporcionar la concentración adecuada de hormonas para el desarrollo y la función sexual masculina. Cualquier anomalía en el sistema puede afectar negativamente la fertilidad. Si el hipotálamo no puede producir la hormona liberadora de gonadotrópicos (GnRH) se producirá una falta de testosterona y la interrupción de la producción de espermatozoides. La falta de GnRH provoca un grupo de trastornos conocidos como hipogonadismo hipogonadotrópico. De manera similar, la incapacidad de la hipófisis para producir cantidades suficientes de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) dará como resultado una falla para estimular a los testículos y producir testosterona y espermatozoides. Por otra parte, las concentraciones elevadas de LH y FSH también se asocian con concentraciones bajas de testosterona debido al feedback negativo que estas altas concentraciones producen, lo cual también conducirá a alteraciones en la espermatogénesis. Finalmente, el aumento de prolactina también puede conducir a una reducción de la producción de espermatozoides (Corradi et al., 2016).

ESTILO DE VIDA Y CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

En un estudio reciente xxx describen numerosas causas relacionadas con el estilo de vida y la contaminación ambiental que pueden producir alteraciones en la calidad seminal del paciente. Entre ellas, enumera el consumo de sustancias como el tabaco y el alcohol, el uso repetido de drogas sociales se asocian a una disminución significativa en los niveles de testosterona, y por consiguiente, en la concentración de espermatozoides. También mencionan la mala nutrición con un efecto importante en la infertilidad masculina. Otros factores importantes son la exposición a sustancias peligrosas tales como solventes, insecticidas, adhesivos, siliconas, etc. Este grupo incluye también, la exposición a la radiación producto del uso intensivo de tecnologías modernas, la vida sedentaria, las altas temperaturas, la contaminación ambiental (Mann et al., 2020).

EPIGENÉTICA

El término epigenética se refiere a los mecanismos hereditarios de modulación de la expresión génica (regulación de la cromatina y por ende la integridad del genoma) que no involucran alteraciones en la secuencia del ADN. La metilación del ADN, la modificación de histonas y los ARNs pequeños son mecanismos moleculares asociados con la regulación epigenética de los genes. Estos interactúan y se estabilizan entre ellos, de modo que, perturbaciones en al menos uno de ellos puede llevar a una expresión inapropiada o al silenciamiento de los genes, llevando a una “enfermedad epigenética” como el cáncer y trastornos de “imprinting”. El patrón epigenético comienza en la línea germinal; teniendo un rol en la expresión génica, la meiosis, la integridad del genoma y el “imprinting” genómico, y es esencial para la programación del desarrollo embrionario, que en parte, es codificada por la información epigenética contenida en los espermatozoides siendo capaz de alterar el fenotipo de la próxima generación (Donkin & Barrès, 2018; Trasler, 2010).

Hasta el presente, numerosas investigaciones han mostrado que alteraciones epigenéticas en los espermatozoides se asocian a oligozoospermia y oligoastenoteratozoospermia. Además, se han reportado en múltiples estudios que la hipermetilación en varios genes, conduce a deficiencia en los parámetros del semen o infertilidad masculina (Cescon et al., 2020). En el caso contrario, también se comprobó que la hipometilación del ADN de los espermatozoides está asociada con la hipoespermatogénesis (Agarwal et al., 2019). Estos errores de metilación en el ADN son serios porque no solo tienen efecto en el paciente sino que puede tener un gran impacto en la fertilidad de las próximas generaciones, pasando esta información del gameto a la descendencia (Gallo et al., 2020).

ESTRÉS OXIDATIVO

Se trata de un marcador seminal indirecto de problemas de fertilidad, que se presenta por excesivos niveles de ROS (en inglés ROS, Reactive Oxygen Species) en el tracto seminal y produce una alteración en los parámetros seminales tales como concentración, movilidad y morfología. Además, las ROS también son producto del propio metabolismo espermático y juegan un papel importante en la señalización normal en las vías metabólicas que confieren capacidad fecundante a los espermatozoides (Ribas Maynou et al., 2020). A pesar de ello, las gametas masculinas son muy susceptibles a las agresiones oxidativas y el exceso de éstas puede causar daño estructural de membrana (lipoperoxidación) y por ende ingreso al núcleo de nucleasa que provocan daño funcional del ADN espermático (lesiones monocatenarias y bicatenarias), de modo que detiene o induce la transcripción de genes y aún con el ADN dañado es capaz de fecundar, teniendo consecuencias no deseadas durante la fecundación del

ovocito por parte del espermatozoide, llegando al extremo de dañar la integridad genética del embrión resultante (Perrault, 2010; Chianese y Pierantoni, 2021).

DEFECTOS GENÉTICOS

Los factores genéticos en hombres se detectan en el 15% de los casos y se pueden clasificar en dos grupos: anomalías cromosómicas y mutaciones de un solo gen. Cualquier delección o adquisición de reordenamientos inusuales en el material genético a nivel cromosómico se conoce como anomalías cromosómicas y es una de las principales causas genéticas involucradas en la infertilidad masculina. Algunas anomalías cromosómicas se heredan y otras se adquieren.

Entre aquellos que afectan específicamente al aparato reproductor masculino se encuentran: el Síndrome de Klinefelter, loci genéticos, alteración de un único gen o un defecto estructural o numérico de los cromosomas: microdelecciones, delecciones del cromosoma Y, de genes ligados al X y de autosomas, daño del ADN mitocondrial, desgaste de los telómeros, anomalías genéticas del eje hormonal: hipotálamo-hipofisis-gonadas (Kamiński et al., 2020).

FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

La compactación y estabilización de la cromatina nuclear espermática protege la integridad del genoma durante el tránsito del espermatozoide por la vía masculina y femenina hasta alcanzar el sitio de fecundación (Paparella et al., 2017) y allí se complementa con el genoma del ovocito para contribuir a un cigoto euploide ($2n$) con la integridad adecuada del ADN (Ribas Maynou et al., 2019). Su integridad es esencial ya que representa la mitad del futuro genoma del embrión, por lo que daños en ella altera en primer lugar los parámetros vinculados a la capacidad fecundante del espermatozoide y luego compromete el desarrollo de una descendencia sana. Este daño, conocido como fragmentación del ADN espermático, aumenta con la edad, comenzando en los años reproductivos y duplicándose entre las edades de 20 y 60 años. Dicha asociación se ha atribuido a una mayor exposición al estrés oxidativo, el empaquetamiento defectuoso de la cromatina espermática y la apoptosis desordenada que se produce con el envejecimiento (Agarwal et al., 2020b).

Esta causa de infertilidad masculina se ha estudiado ampliamente desde comienzos del siglo XX, aportando paulatinamente nuevos conocimientos sobre la fisiología del ADN espermático y su efecto sobre la capacidad fecundante. En la década de 1940 se descubrió la singularidad del complejo proteico de los espermatozoides que estabiliza el ADN, siendo compuesto principalmente por protaminas en lugar de histonas, que generan una mayor compactación de la cromatina en el núcleo espermático. En los años cincuenta y sesenta se investigó la

asociación entre la estructura inestable de la cromatina y la subfertilidad masculina, y se descubrió que la calidad de una muestra de semen era más que una cuestión de número y movilidad de los espermatozoides. En los años setenta, se investigó la asociación entre la exposición a agentes que dañan el ADN espermático y una posible reducción de la fertilidad. Ya en la década de 1980 se introdujo el concepto de fragmentación del ADN espermático relacionado con la infertilidad, así como la primera prueba de fragmentación del ADN: el ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA), producto del avance tecnológico de la biología molecular. En los años noventa se desarrollaron nuevas pruebas para determinar la fragmentación del ADN espermático, cobrando mayor relevancia la técnica de TUNEL (Rex et al., 2017), ya que durante este período acontece la fertilización *in vitro* (FIV) empleando inyección intracitoplasmática de un único espermatozoide (ICSI), siendo este el tratamiento ideal para tratar el factor masculino debido a que proporciona a los pacientes tasas de fecundación y de nacidos vivos más altas al seleccionar un espermatozoide para introducirlo mecánicamente dentro de cada ovocito a partir de una pequeña cantidad de espermatozoides.

En las últimas dos décadas el estudio de la fragmentación del ADN se enfocó en su etiología, cuya teoría desarrollada sostiene que puede ser causada por los factores extrínsecos descritos, así como factores intrínsecos (la maduración defectuosa de células germinales, la apoptosis abortiva y el estrés oxidativo). Hay pruebas contundentes que demuestran que el estrés oxidativo es un factor importante que contribuye a la infertilidad masculina. Las ROS son vitales para procesos fisiológicos como la apoptosis y la capacitación espermática, pero una sobreproducción conduce a varias consecuencias deletéreas, incluida la fragmentación del ADN espermático. Dicha fragmentación puede afectar la fertilidad en general, es decir, tanto la concepción natural como la asistida (Agarwal et al., 2020b).

En los últimos años se ha descrito que diferentes tipos de roturas del ADN de los espermatozoides (roturas del ADN de una o dos hebras) provocan diferentes efectos reproductivos clínicos. Por un lado, las roturas de ADN monocatenario están presentes ampliamente como múltiples puntos de rotura en todas las regiones del genoma, están relacionadas con el estrés oxidativo y provocan una falta de embarazo clínico o un aumento del tiempo de concepción. No obstante, los niveles más altos de fragmentación monocatenaria están inversamente relacionados con el resultado natural del embarazo. Por otro lado, las roturas del ADN de doble hebra se localizan y adhieren principalmente a la matriz nuclear del espermatozoide como muy pocos puntos de rotura, posiblemente están relacionadas con una reparación del ADN defectuosa en la meiosis y provocan un mayor riesgo de aborto recurrente, pobre calidad embrionaria y mayor riesgo de falla de implantación en ciclos ICSI (Agarwal et al., 2020b; Marzano et al., 2019; Ribas Maynou et al., 2019). Por lo tanto, observando los resultados clínicos en función de la integridad genómica del gameto masculino, es evidente que se necesitan desarrollar herramientas terapéuticas para tratar los casos de fragmentación del

ADN espermático aumentado. De hecho es imprescindible la selección de espermatozoides sanos para garantizar un embarazo exitoso y una descendencia sana. Asimismo, el uso del método de procesamiento de semen óptimo debería proporcionar los espermatozoides más saludables para los tratamientos de reproducción asistida (Gode et al., 2020; Yetkinel et al., 2019).

Adicionalmente, es importante mencionar que existe una serie de estrategias para reducir la fragmentación del ADN espermático en una muestra de semen. Algunas de estas estrategias están relacionadas con cambios en el estilo de vida del paciente y otras con tratamientos sobre la muestra de semen propiamente dicha. En el primer grupo se encuentran la reducción de la ingesta de grasas, alcohol, drogas y medicamentos, evitar la exposición a contaminantes y promover el consumo de antioxidantes y suplementos que mejoren la espermatogénesis y disminuya las ROS (Yao y Mills, 2016). El segundo grupo está compuesto por los métodos de laboratorio que permiten seleccionar a los espermatozoides de mejor calidad y con menor fragmentación del ADN: swim-up, gradiente de densidad, columnas de Anexina-V y sistemas microfluídicos (Quinn et al., 2018). Finalmente, si los niveles de fragmentación del ADN espermático son muy elevados en el eyaculado algunos autores proponen que se recurra a la selección espermática basada en la extracción de espermatozoides testiculares (Esteves, 2020; Kim, 2018). Esta última estrategia se ofrece en centros de fertilidad de todo el mundo a pesar de que no está respaldado por las principales organizaciones de fertilidad (Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva, Sociedad Europea de Endocrinología Reproductiva Humana y Sociedad Canadiense de Andrología de la Fertilidad), debido a que los estudios no proporcionan evidencia consistente en los resultados reproductivos para respaldar el uso de este procedimiento (Jarvi, 2020).

Clásicamente, el procesamiento de espermatozoides para el tratamiento de fertilidad se ha realizado con un simple lavado con medio de cultivo, swim-up de los espermatozoides fuera del plasma seminal, centrifugación en gradiente de densidad o una combinación de ambos métodos descritos por la OMS en el año 2010 (Smith et al., 2017). Además, los mismos permiten eliminar el plasma seminal, los desechos, las prostaglandinas y otras sustancias perjudiciales para la viabilidad de los espermatozoides (Fácio et al., 2016). Dichas técnicas son hace ya varias décadas de uso rutinario en el laboratorio de andrología. Desde sus orígenes en 1990 poco han evolucionado a pesar de que varios estudios han relacionado que los pasos de centrifugación implicados generan ROS que disminuyen la integridad del ADN y dañan a los espermatozoides, pudiendo tener efectos a largo plazo sobre la viabilidad de los embriones (Samuel et al., 2018). En años recientes, han surgido desarrollos tecnológicos para tratar muestras de semen, como la microfluídica, la electroforesis, el examen de morfología de orgánulos de espermatozoides móviles (MSOME) y la birrefringencia, que eliminan los pasos

de centrifugación y pueden mejorar la selección de espermatozoides, algunas de las cuales ya son de uso habitual en el laboratorio (Rappa et al., 2016).

De la amplia cantidad de técnicas de vanguardia, aún bajo investigación clínica, los dispositivos que emplean la microfluídica, han demostrado la capacidad de mejorar de manera eficiente y consistentemente los parámetros clave del análisis de semen como el recuento, la motilidad y la morfología de los espermatozoides. A continuación se describe la razón por la cual se cree que tienen el potencial de abrir un nuevo enfoque para la manipulación de espermatozoides tanto en la investigación como en las clínicas de fertilidad (Samuel et al., 2018).

En cuanto a la base teórica, la microfluídica se ocupa de la manipulación de pequeñas cantidades de volumen dentro de un microdispositivo conocido como lab-on-a-chip (LOC), que ofrece análisis rápidos, facilidad de uso, pequeños volúmenes de muestra de reactivo, procesamiento de alto rendimiento y amplia reproducibilidad debido a la automatización y estandarización (Marzano et al., 2019).

Esta tecnología aplicada a la selección espermática ofrece la oportunidad de modelar en tres dimensiones los entornos biofísicos y bioquímicos encontrados por los espermatozoides que se mueven a través del tracto reproductivo femenino, de modo que imitan de manera más aproximada las presiones de selección natural que actúan sobre los gametos masculinos *in vivo* y también proporcionan un medio fisiológico más eficiente para la selección de espermatozoides de acuerdo con la morfología normal, la motilidad y una mayor integridad del ADN para la tecnología de reproducción artificial, que se logra debido a su protocolo de clasificación en un solo paso evitando la necesidad de centrifugar la muestra. La eliminación del paso de centrifugación minimiza la exposición de los espermatozoides a las ROS que esta manipulación produce, preservando la integridad de la cromatina (Štiavnická et al., 2017; Suarez y Wu, 2017).

Si bien algunos de los sistemas microfluídicos pueden seleccionar suficientes espermatozoides para la inseminación intrauterina (>5.000.000 de espermatozoides), la gran mayoría selecciona una subpoblación mucho más pequeña y más pura apta para la fecundación *in vitro* (~100.000 espermatozoides). Lo que significa que la calidad de los espermatozoides seleccionados está inversamente relacionada con la cantidad de los mismos. Como resultado, generalmente, la subpoblación que seleccionan estos sistemas es casi 100% móvil y es de mayor calidad en términos de morfología e integridad del ADN que la muestra de semen sin procesar (Samuel et al., 2018).

El sistema que selecciona espermatozoides para tratamientos de fecundación *in vitro* discrimina espermatozoides de una muestra de semen mediante un filtro de membrana porosa

(8 micrones) que actúa como mecanismo de barrera. Los espermatozoides son seleccionados según su capacidad natatoria. Sólo los espermatozoides móviles nadan y los más competentes (motilidad, morfológica y genéticamente) logran atravesar dicha membrana; por el contrario, los espermatozoides inmóviles quedan retenidos por debajo de la membrana. Con este método de separación, los espermatozoides no sufren estrés físico adicional de fuentes como una centrífuga, por lo que se minimiza el daño inducido al ADN (Shirota et al., 2016).

A pesar de los pocos estudios existentes, estos garantizan que los sistemas microfluídicos son una herramienta eficiente (Asghar et al., 2014; Parrella et al., 2019). Pese a ello, se deben considerar a estos dispositivos aún bajo prueba y comparar en forma definitiva el grado de efectividad que poseen en comparación con las técnicas de selección espermática convencionales, ya que se trata de una metodología emergente. Es por eso que los nuevos estudios sobre el tema están aportando más conocimiento para entender el mecanismo fino de acción y permiten aumentar el volumen de datos científicos que ayuden a validar estos dispositivos en forma definitiva.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de tres técnicas de selección de espermatozoides sobre los niveles de fragmentación del ADN espermático.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar qué técnica de separación espermática es más eficiente para reducir los niveles de fragmentación del ADN espermático, comparando tres técnicas: gradiente de densidad, swim-up y un sistema microfluídico.
- Determinar y comparar los parámetros seminales básicos luego del procesamiento mediante las técnicas mencionadas.
- Determinar cuál de las técnicas es más apropiada para ser aplicada en inseminación artificial y fecundación *in vitro*.

HIPÓTESIS

1. El gradiente de densidad proveerá de muestras con mayor concentración espermática y movilidad progresiva.
2. La técnica de swim-up promoverá una mayor disminución de la fragmentación del ADN espermático al compararlo con el gradiente de densidad.
3. El sistema microfluídico mejorará la selección de espermatozoides llevando los niveles de fragmentación del ADN espermático a 0%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un análisis estadístico en un estudio prospectivo, para comparar el efecto del empleo de tres métodos diferentes de procesamiento de semen sobre la fragmentación del ADN espermático en una población de hombres normozoospermicos que realizaron tratamiento de fertilidad en el Laboratorio de Andrología de Medicina Reproductiva Fertilis. Se registraron los parámetros seminales básicos: volumen, concentración y movilidad; y el nivel de fragmentación del ADN espermático, tanto en el espermograma original como de las muestras luego del procesamiento.

Para que las muestras fueran incluidas en el experimento debían cumplir con los parámetros publicados en el manual de la OMS, 2010 (Tabla 2). En cuanto a los criterios de exclusión, fueron excluidos aquellos pacientes con azoospermia, criptozoospermia, eyaculación retrógrada, leucocitospermia y los que habían sido expuestos a quimioterapia, radioterapia o pesticidas u otros tóxicos y también los pacientes con una historia de infección o fiebre en los 3 meses previos al tratamiento.

Tabla 2. Valores seminales de referencia para el criterio de inclusión (OMS, 2010).

Parámetro seminal	Valor de referencia
Volumen	≥2.0 ml
Concentración espermática	≥15 x10 ⁶ spz / ml
Espermatozoides móviles progresivos	≥32%
Viabilidad	≥58%
Formas espermáticas normales	≥4%
Concentración de leucocitos	≤1 x10 ⁶ leucocitos / ml

A continuación se describen los equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo empleados en los experimentos (Tablas 3, 4 y 5).

LISTADO DE EQUIPOS, MATERIAL DESCARTABLE, REACTIVOS Y MEDIOS EMPLEADOS

Tabla 3. Listado de equipos utilizados.

Equipos de laboratorio	Fabricante	Origen
Platina térmica	Microvision	Argentina
Cámara de Makler	Sefi Medical	Israel
Centrífuga	Arcano	China
Thermo fisher	Forma	Inglaterra
Microscopio de fluorescencia S320	Nikon	Japón
Pipetas	finnpipette	Inglaterra
Platina térmica	Microvision	Argentina

Tabla 4. Listado de material descartable utilizado.

Material descartable	Fabricante	Origen	#Catálogo
Cubreobjetos 24x50 mm	Sail Brand	China	7201
Microtubos 0.2 ml	Corning	Inglaterra	6531
Pipeta serológica de 2 ml	Nunc	Dinamarca	159617
Placa de Petri	Nunc	Dinamarca	150360
Teflon Printed Slide para TUNEL	EMS	USA	63429-04
Tips 0-10 µl	Corning	México	4894

Tips 0-200 µl	Corning	México	4864
Tubo de centrifuga de 15 ml	Thermo Scientific	Corea	339651
ZyMot	DxNow Inc.	USA	ZPH1000

Tabla 5. Listado de reactivos y medios utilizados.

Reactivos y medios	Fabricante	Origen	#Catálogo
Aceite de Inmersión	Sigma	USA	I-0765
Albúmina Bovina Fracción V	Sefi Medical	USA	a3059
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	Arcano	USA	30063721
Formaldehído 37%	Forma	USA	F8775
In situ Death Cell Detection kit	Nikon	USA	116847959 10
Metanol	finnpipette	USA	494437
mHTF (modified Human Tubal Fluid)	Irvine	USA	90163
PBS	Irvine	USA	9235
Polilicina 0.1%	Sigma	USA	P8920
Sperm Grad	Vitrolife	USA	10099
Suero Sintético (SSS)	Irvine	USA	99193
UltraPure Distilled Water	Invitrogen	USA	10977-015
Vecta-shield	Vector Lab	USA	H-1000

METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA REALIZAR EL ESPERMOGRAMA CON ESTUDIO DE FRAGMENTACIÓN DE ADN

Para realizar la técnica de TUNEL se utilizaron muestras de semen obtenidas por masturbación, recolectadas en un recipiente estéril y llevadas al laboratorio dentro de la hora de recolección. Una vez allí, se las rotuló detallando los datos del paciente, su pareja, edad de ambos, hora de obtención y días de abstinencia.

En primer lugar, se registraron las características macroscópicas de las muestras evaluando: volumen, licuefacción, viscosidad, aspecto, color, turbidez y pH. Posteriormente, se llevó a cabo el examen microscópico en el cual se determinó la concentración, motilidad, morfología y vitalidad espermáticas, presencia de otras células y aglutinación.

Cada muestra fue procesada por gradiente, swim-up o un dispositivo microfluídico, según el experimento correspondiente, y una vez finalizados los procedimientos se separaron 100 μ l de muestra resuspendida para realizar la prueba de TUNEL.

TÉCNICA DE SWIM-UP

Para realizar esta técnica las muestras fueron divididas en dos fracciones y sembradas en tubos de centrifuga de 15 ml que contenían 2 ml de mHTF suplementado con 3% SSS (mHTF+3%SSS). Luego de ello, los tubos fueron incubados por una hora a 37°C en un cubo térmico. Posteriormente, se tomó con una pipeta serológica los 2 ml de mHTF+3%SSS de cada tubo y se los colocó en un nuevo tubo de 15 ml, el cual fue centrifugado durante 5 min a 300g. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las muestras fueron resuspendidas en mHTF+3%SSS, llevando a un volumen final de 0,4 ml o 0,85 ml según el experimento.

TÉCNICA DE SEPARACIÓN POR GRADIENTE DE DENSIDAD

La técnica se realizó de acuerdo con los siguientes pasos. En primer lugar, para formar el gradiente, se depositó con pipeta serológica 0.5 ml de la solución al 50% en el fondo de un tubo de centrifuga de 15 ml, y por debajo de ella 0.5 ml de la solución al 90%. Una vez obtenido el gradiente, se colocó lentamente por encima de éste toda la muestra de semen y se centrifugó por 20 min a 300g. Una vez finalizada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de mHTF+3%SSS. Esta solución fue centrifugada nuevamente por 10 min a 300g y se descartó el sobrenadante. Por último, el precipitado fue diluido en mHTF+3%SSS llevando el volumen final a 0.4 ml.

TÉCNICA DE SISTEMA MICROFLUÍDICO

Para este procedimiento se utilizó el chip microfluídico ZyMot, el cual consiste en una placa que contiene una membrana microfluídica (con poros de 8 micrones) de un solo uso, que divide la cámara de trabajo en dos secciones: una inferior de 0,85 ml y una superior de 2 ml. La cámara inferior es la cámara de entrada de la muestra, y la cámara superior es la cámara a la que acceden los espermatozoides seleccionados luego del paso por la membrana microfluídica (Gode, 2020).

En primer lugar, se tomaron 0.85 ml de cada muestra de semen fresca y se los colocó en el dispositivo a través del orificio de carga, llenando de esta forma el compartimento inferior. A continuación, se agregaron 2 ml de mHTF+3%SSS en el compartimento superior del sistema. (Fig. 2). El dispositivo se incubó durante 30 min en cámara húmeda a 37°C, luego de lo cual se recolectaron 0,85 ml de la solución resultante en la cámara superior, lo cual consiste en la solución de trabajo.



Fig. 2. Vista del dispositivo microfluídico.

TÉCNICA DE TUNEL

Una vez procesadas las muestras por gradiente, swim-up y/o sistema microfluídico, se tomaron 100 ul de las mismas para fijarlos agregando 5 ul de Formaldehído al 37% para el futuro

procesamiento por TUNEL. Dichas muestras fueron colocadas en heladera hasta el momento de uso.

Para realizar la técnica de TUNEL, los portaobjetos especiales fueron sumergidos por al menos 2 horas en Polilicina 0.1% y enjuagados con agua ultrapura. Luego del secado a temperatura ambiente, se dividieron los pocillos por paciente y por muestra pre y post procesada (Fig. 3). Luego, se retiraron de la heladera las muestras fijadas con Formaldehído al 37% y se sembraron 30 μ l de cada una de ellas en sus correspondientes pocillos por duplicado. Cada uno de los portaobjetos se guardó dentro de una cámara húmeda conformada por una placa de Petri y papel tissue húmedo en su interior a 37°C por 1 hora (Fig. 4). Se dejaron reposar en el refrigerador por 24 horas. Al día siguiente, se lavaron las muestras por triplicado con 10 μ l de PBS 1x, cada una durante 5 min. Luego se agregó Metanol por 90 segundos y se repitieron los 3 lavados con PBS 1x. Se colocaron 10 μ l de solución de bloqueo PBS+0.5%BSA dejándola por 50 min dentro de la cámara húmeda en la heladera y una vez concluido ese tiempo, se realizaron otros 3 lavados con PBS 1x. Protegidos de la luz, a cada pocillo se le añadió una mezcla de 4.5 μ l de label y 3.5 μ l de enzima y los portaobjetos se dejaron dentro de la cámara húmeda por una hora sobre una platina térmica a 37°C. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con 10 μ l de PBS 1x y se dejó secar por completo a temperatura ambiente, siempre evitando exposición a luz. Por último, se agregaron 5 μ l de agente de montaje Vecta-Shield a cada pocillo y por encima se colocó un cubreobjetos de 24x50 mm.

Finalmente, se observó en el microscopio de fluorescencia a un aumento de 100X bajo aceite de inmersión. En cada ensayo se analizaron 200 espermatozoides. Los espermatozoides que presentaron ADN fragmentado se observaron con fluorescencia verde. Además, se consideró con marcación positiva a aquellos espermatozoides con fluorescencia mayor al 50% en el citoplasma, mientras que el resto de las células fueron consideradas negativas (Fig. 5). Se registró el número de espermatozoides por marcación positiva en un recuento de 200 espermatozoides totales.

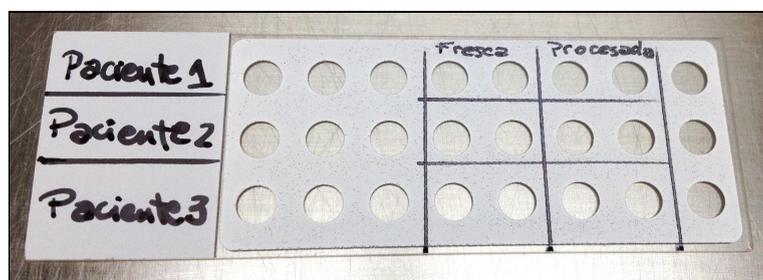


Fig. 3. Portaobjetos de TUNEL.

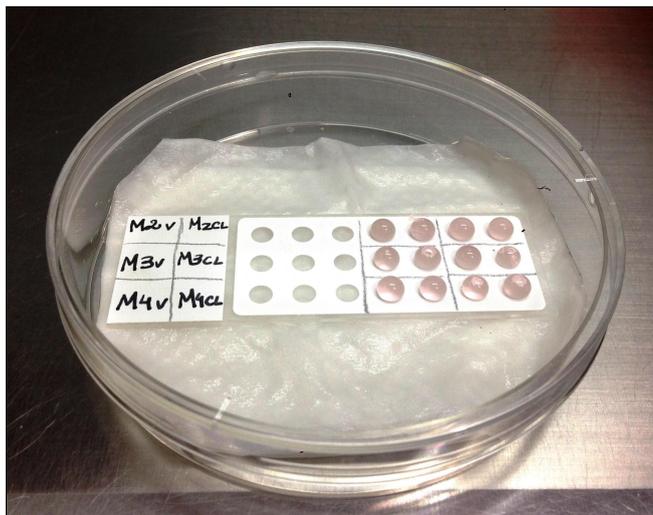


Fig. 4. Cámara húmeda con muestras para TUNEL sembradas en el portaobjetos.

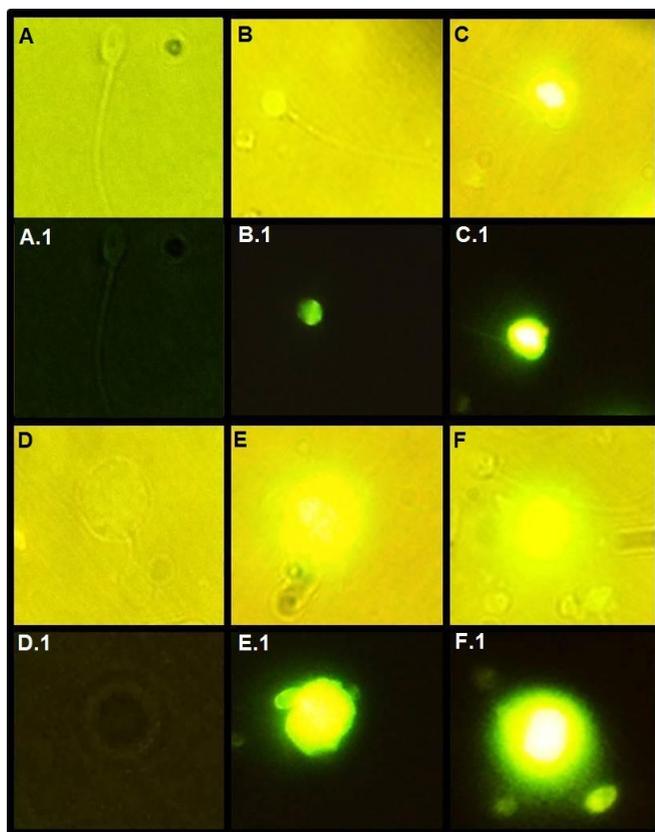


Fig. 5. Espermatozoides y células no espermáticas con diferentes marcaciones para TUNEL. A: Espermatozoide negativo en luz blanca; A.1: espermatozoide negativo con 0% de fluorescencia bajo luz UV. B: Espermatozoide negativo con <50% de fluorescencia en luz blanca; B.1: Espermatozoide negativo con <50% de fluorescencia en luz UV. C: Espermatozoide positivo con >50% de fluorescencia en luz blanca; C.1: Espermatozoide positivo con >50% de fluorescencia en luz UV. D: Célula no espermática con 0% de fluorescencia en luz blanca; D.1: célula no espermática con 0% de fluorescencia bajo luz UV. E: Célula no espermática negativa con <50% de fluorescencia en luz blanca; E.1: célula no espermática negativa con <50% de fluorescencia bajo luz UV. F: Célula no espermática positiva con >50% de fluorescencia en luz blanca; E.1: célula no espermática positiva con >50% de fluorescencia bajo luz UV.

EXPERIMENTO 1: COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO LUEGO DEL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SEMEN MEDIANTE GRADIENTE O SWIM-UP

En este experimento se utilizaron 25 muestras de semen de pacientes con indicación de espermograma completo y análisis de fragmentación del ADN espermático. Las edades de dichos pacientes oscilaron entre los 30 y 39 años (edad promedio 34.3 ± 2.4). Los pacientes firmaron el consentimiento de investigación correspondiente.

Las muestras fueron divididas en dos fracciones tratando cada una ya sea por gradiente de densidad o swim-up. En este experimento se comparó la fragmentación del ADN post procesamiento de las muestras con ambas metodologías (Fig. 6).

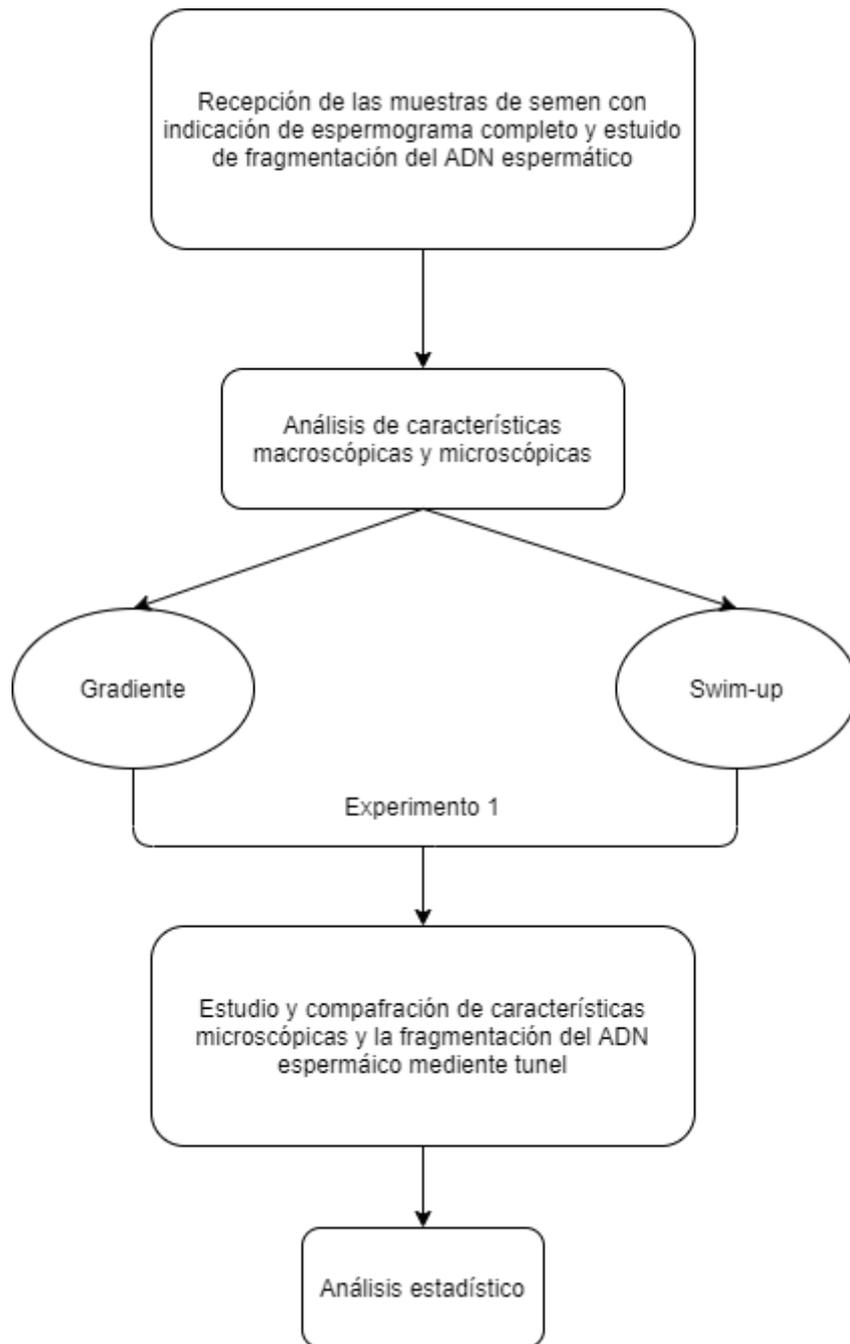


Fig .6. Diagrama de flujo que representa sintéticamente el diseño del Experimento 1.

EXPERIMENTO 2: COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO LUEGO DEL PROCESAMIENTO DE SEMEN MEDIANTE SWIM-UP O UN SISTEMA MICROFLUÍDICO

En el experimento 2 se utilizaron 19 muestras de semen entregadas para realizar una fecundación *in vitro*. Los pacientes aportantes de las muestras habían realizado espermogramas previos en los cuales se había determinado niveles de fragmentación del ADN >20% luego del procesamiento por gradiente de densidad. El promedio del nivel de fragmentación espermática fue 25.8 ± 2.6 . Las edades oscilaron entre los 32 y 38 años (edad promedio 34.4 ± 1.9).

Se tomaron dos fracciones de 0,85 ml de muestra para procesarlas mediante swim-up o el dispositivo microfluídico. En este segundo experimento se comparó la fragmentación del ADN espermático post procesamiento de las muestras mediante ambas metodologías (Fig. 7).

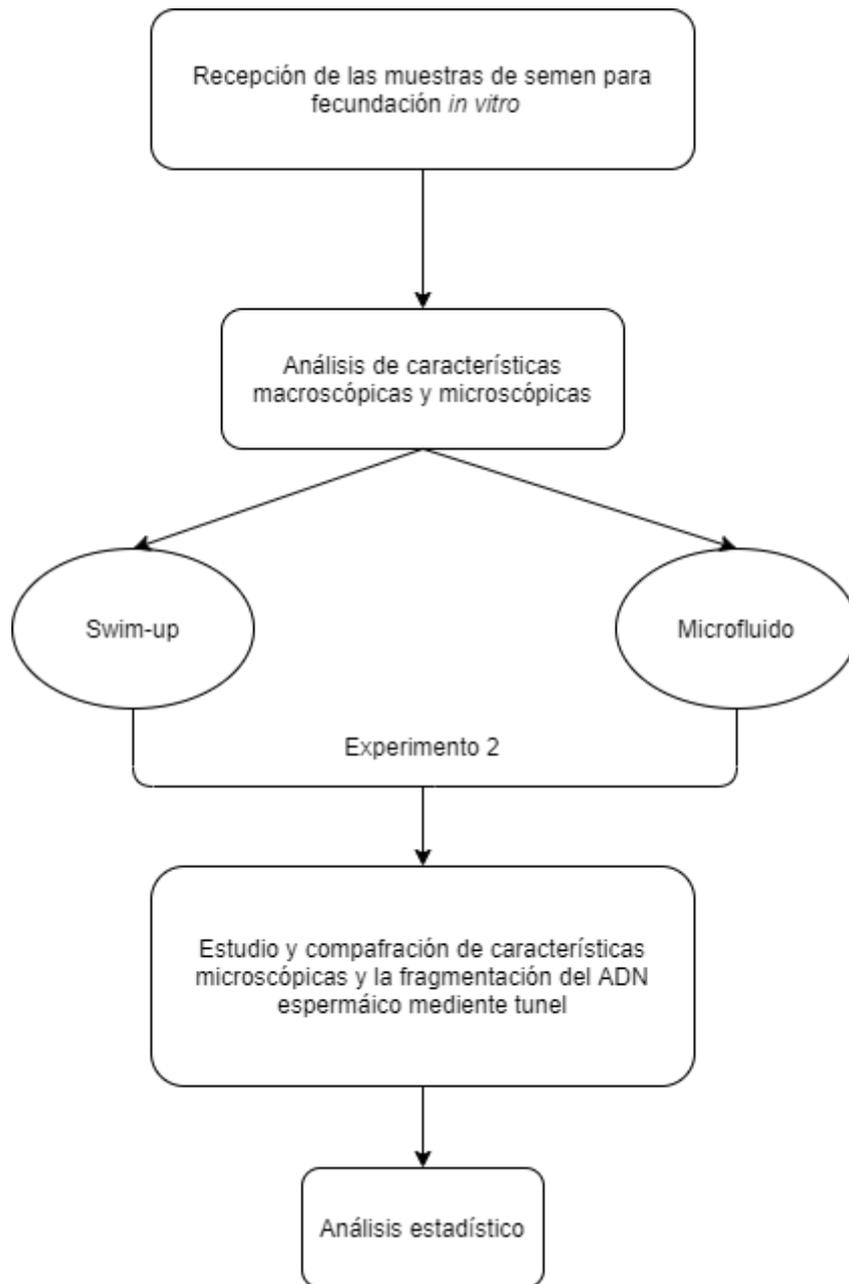


Fig. 7. Diagrama de flujo que representa sintéticamente el diseño del Experimento 2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado empleando el Mann Whitney Test o el Kruskal-Wallis Test según correspondiera, empleando el programa InStat versión 7 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1: GRADIENTE VS SWIM-UP

En la tabla 6 se detallan los valores promedio de los parámetros seminales de las 25 muestras de semen procesadas en el Experimento 1.

Tabla 6. Parámetros seminales iniciales de las muestras empleadas en el experimento 1 ($n = 25$).

Parámetros seminales	Valores \pm SD
Volumen (ml)	2.9 \pm 0.7
Concentración espermática ($\times 10^6$ spz/ml)	63.0 \pm 21.6
Espermatozoides totales ($\times 10^6$ spz)	182.3 \pm 75.4
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	48.3 \pm 9.4
Espermatozoides con movilidad in situ (%)	2.6 \pm 0.2
Espermatozoides inmóviles (%)	49.2 \pm 9.4

SD = desviación estándar

Al comparar los resultados obtenidos luego del procesamiento de la muestra mediante gradiente y swim-up se observó que la fracción de la muestra procesada por gradiente de densidad tuvo significativamente una mayor concentración espermática y un mayor número de espermatozoides progresivos totales; mientras que, la fracción procesada por swim-up mostró significativamente una mayor porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y menor porcentaje de fragmentación del ADN espermático (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros seminales de la muestra luego de procesamiento mediante gradiente y swim-up.

Parámetros seminales	Gradiente \pm SD	Swim-up \pm SD
----------------------	--------------------	------------------

Concentración espermática (x10⁶ spz/ml)	62.8 ± 23.2 a	32.4 ± 8.3 b
Espermatozoides móviles progresivos (%)	95.0 ± 4.1 a	98.4 ± 2.4 b
Espermatozoides progresivos totales (x10⁶ spz)	24.0 ± 9.3 a	12.6 ± 3.3 b
Fragmentación del ADN espermático (%)	19.2 ± 5.1 a	9.1 ± 1.9 b

SD = desviación estándar
(a,b) difieren significativamente (p < 0.05)

EXPERIMENTO 2 : SWIM-UP VS. DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO

En la tabla 8 se detallan los valores promedio de las 19 muestras de semen procesadas en el Experimento 2.

Tabla 8. Parámetros seminales iniciales de las muestras empleadas en el Experimento 2 (n = 19).

Parámetros seminales	Valores ± SD
Volumen (ml)	2.8 ± 0.5
Concentración espermática (x10⁶ spz/ml)	105.7 ± 24.8
Espermatozoides totales (x10⁶ spz)	297.2 ± 89.0
Espermatozoides con movilidad progresiva (%)	37.5 ± 10.5
Espermatozoides con movilidad in situ (%)	1.3 ± 0.6
Espermatozoides inmóviles (%)	61.2 ± 10.5

SD = desviación estándar

Al comparar los resultados obtenidos luego del procesamiento de la muestra mediante swim-up y sistema microfluídico, se observó que la fracción de la muestra procesada por swim-up tuvo significativamente una mayor concentración espermática y un mayor número de espermatozoides progresivos totales; mientras que, la fracción procesada por sistema

microfluídico mostró significativamente una mayor porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y menor porcentaje de fragmentación de ADN espermático (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros seminales de la muestra luego de procesamiento mediante swim-up o un sistema microfluídico.

Parámetros seminales	Swim-up	Sistema microfluídico
Concentración espermática ($\times 10^6$ spz/ml)	19.6 \pm 11.1 a	10.4 \pm 6.6 b
Espermatozoides móviles progresivos (%)	97.9 \pm 2.5 a	99.7 \pm 1.2 b
Espermatozoides progresivos totales ($\times 10^6$ spz)	13.4 \pm 3.5 a	8.9 \pm 5.6 b
Fragmentación del ADN espermático (%)	9.1 \pm 2.0 a	1.3 \pm 0.7 b

SD = desviación estándar
(a,b) difieren significativamente ($p < 0.05$)

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar el efecto de tres métodos de separación de espermatozoides sobre los niveles de fragmentación del ADN espermático en muestras de semen. Se observó que procesando las muestras con un sistema microfluídico se obtienen niveles de fragmentación de ADN espermático cercanos a 0%. Esto es muy importante para la aplicación en técnicas de reproducción asistida ya que ha sido demostrado extensamente que muestras de semen con altos niveles de fragmentación del ADN espermático se correlacionan con calidad embrionaria pobre, falla de implantación y pérdida temprana de embarazos (Agarwal et al., 2019; Cissen et al., 2016).

En el primer experimento, donde se comparó la separación de espermatozoides mediante gradiente de densidad y swim-up, se comprobó que con este último se obtienen niveles de fragmentación significativamente menores que con un gradiente de densidad (9.1 ± 1.9 vs 19.2 ± 5.1). Por lo tanto, la técnica de swim-up se presenta como una buena alternativa para disminuir los niveles de fragmentación del ADN espermático en pacientes que van a realizar alguna técnica de reproducción asistida en aquellos casos en los que el laboratorio no cuente con herramientas específicas para tratar muestras de semen con niveles de fragmentación elevados.

Es importante destacar que con el gradiente de densidad se obtiene un mayor número de espermatozoides en cuanto a concentración espermática como espermatozoides progresivos totales. Esto deja lugar a la separación por gradiente de densidad para utilizarlo en inseminación artificial ya que para esta técnica de reproducción asistida no se necesitan muestras de tan buena calidad, priorizando el número de espermatozoides al ser descargados en el útero a la espera de que por mecanismos naturales, el aparato reproductor femenino permita que solo los espermatozoides competentes alcancen la zona de fecundación del óvulo en la trompa de Falopio (Fig. 8).

Si bien el experimento planteado no permite diferenciar entre los espermatozoides que presentaban fragmentación de su ADN previo tratamiento y aquellos a los que se les indujo la fragmentación del ADN durante la aplicación del método de separación, existe abundante bibliografía que muestra que la fragmentación del ADN espermático aumenta luego de la centrifugación (Karimi et al., 2020). Por ello, es lógico pensar que el mayor nivel de fragmentación del ADN espermático luego de la aplicación de la técnica de gradiente de densidad no solo sea producto del nivel de fragmentación del ADN original de la muestra fresca, sino que haya un aporte de la técnica en la que se realizan dos centrifugaciones, una de 20 minutos y otra posterior de 10 minutos. El aporte de la centrifugación en la técnica de

swim-up será seguramente menor ya que esta técnica requiere de una sola centrifugación de 5 minutos.

En el experimento 2 encontramos que el sistema microfluídico lleva la fragmentación a un nivel cercano al 1%, lo cual es significativamente menor que la fragmentación registrada luego de revisar el swim-up (9,1%). Esto determina al sistema microfluídico como el mejor método para disminuir la fragmentación del ADN espermático en la muestra de semen. Esto hace que este sistema sea el más adecuado para aplicar en muestras de semen que serán empleadas en técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (FIV o ICSI). Pese a ello, se debe mencionar que el swim-up es una técnica muy confiable para ser utilizada en estos procedimientos (Fig. 8).

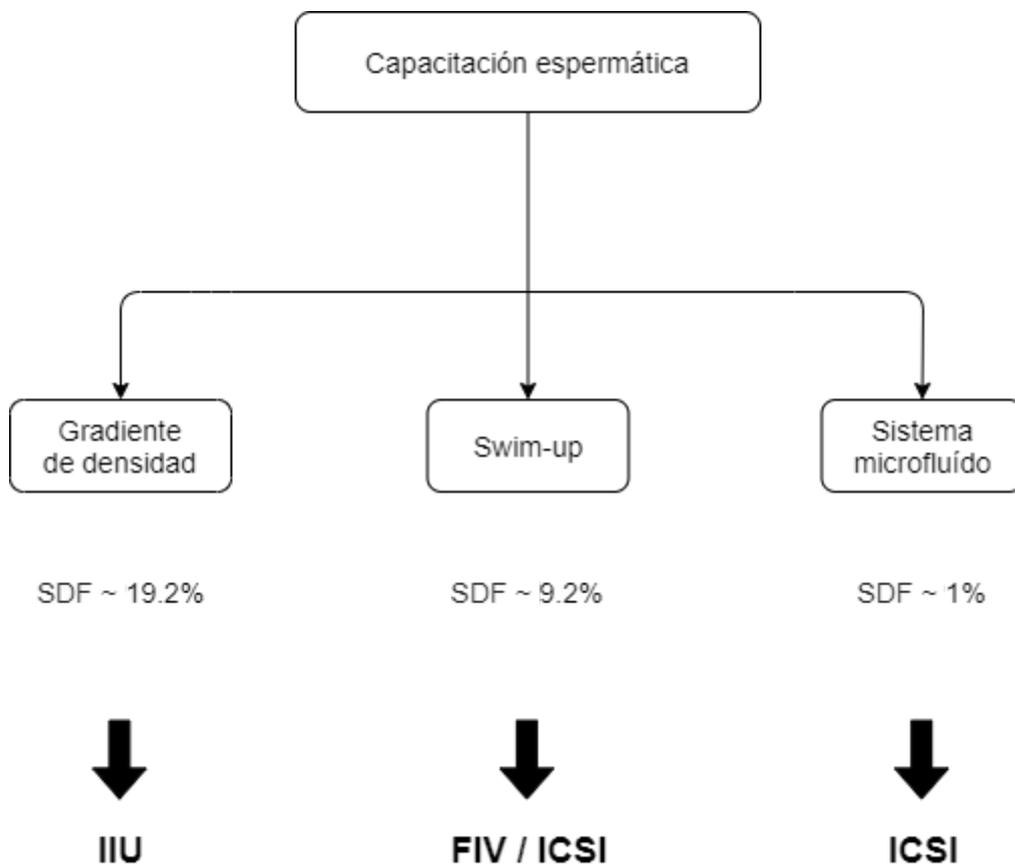


Fig. 8. Técnica de reproducción asistida recomendada en función de la técnica de selección espermática y los niveles de fragmentación del ADN espermático.

También, a partir de los resultados, se puede interpretar que los pasos de centrifugación impactan en la integridad genética de los espermatozoides, tal como se mencionó en el fundamento de esta tesis, ya que en cada experimento hubo diferencias significativas en la fragmentación del ADN espermático entre técnicas. Si bien las estrategias habituales de selección espermática permiten discriminar espermatozoides con menor fragmentación de su

ADN, es probable que durante su procesamiento sufran mayor estrés fisiológico en comparación con el sistema microfluídico, debido a que son sometidos a centrifugación. Por ello, los resultados de fragmentación mejoran cuanto menos pasos de centrifugación incluye la técnica y se maximiza al prescindir de ella.

En cuanto a la diferencia de resultados de los demás parámetros seminales, puede explicarse por el fundamento teórico de cada técnica. En el gradiente de densidad los espermatozoides migran en base a su punto isopícnico, en el swim-up la migración espermática ocurre en base a su movilidad y en el sistema microfluídico la migración se basa en la movilidad y motilidad espermática. Es decir que, según la base teórica para cada metodología, los resultados obtenidos varían.

Las tres técnicas de separación de espermatozoides tienen limitaciones. Las descritas anteriormente sobre la calidad de las muestras obtenidas por gradiente de densidad hacen que esta técnica tenga un uso limitado en las técnicas de fertilidad, quedando relegada sólo al tratamiento de muestras con viscosidad aumentada. Esto último está relacionado con las limitaciones propias del swim-up y el sistema microfluídico.

Cuando una muestra de semen presenta viscosidad aumentada no se puede realizar swim-up debido a que es imposible realizar el procedimiento sin que el sistema completo se mezcle al depositar el semen en el fondo del tubo con la pipeta. Mientras que, este tipo de muestras limita el uso de sistemas microfluídicos ya que, es imposible cargar el chip debido a la viscosidad, o en aquellos casos en los que se logra cargar el chip, la recuperación es extremadamente pobre.

Por otra parte, muestras con baja densidad espermática también limitan el uso del swim-up y el sistema microfluídico. Como se vió en el Experimento 1, con el swim-up, se obtienen menores concentraciones espermáticas que con el gradiente de densidad, por ello, cuando la muestra fresca tiene baja concentración el swim-up recuperará escasos espermatozoides, lo cual muchas veces puede provocar que se deba realizar la fecundación mediante la técnica de ICSI en lugar de un FIV convencional. Esto aumenta la complicación en el laboratorio y muchas veces afecta el porcentaje de fecundación de los ovocitos. El caso del sistema microfluídico es aún más marcado ya que si la muestra de semen fresca tiene muy baja concentración, es muy probable que la recuperación sea extremadamente escasa o nula. Esto provocaría que se deba realizar un ICSI, o tener que pedir una segunda muestra del paciente para volver a procesar por gradiente de densidad.

Como se mencionó en la introducción, existe otro método de selección de espermatozoides para muestras con altos niveles de fragmentación del ADN espermático denominado columnas

de Anexina-V. Este método no fue empleado en el presente estudio ya que el laboratorio de andrología de Fertilis no cuenta con este sistema. La razón para ello es el alto costo de materiales, el corto vencimiento de los kits de trabajo y el hecho de no estar probado el efecto real que el elevado campo magnético al que se someten los espermatozoides que pasan por él durante la selección (De Gheselle et al., 2020).

Más allá de que el Laboratorio de Andrología cuente con un método de separación de espermatozoides con el ADN fragmentado, tanto el andrólogo como el médico especialista en fertilidad deben tener en cuenta que existen estrategias previas para disminuir la fragmentación del ADN espermático. Es muy importante que el médico aconseje a los varones sobre el efecto que algunos hábitos de su estilo de vida tienen sobre la calidad seminal, en particular sobre la fragmentación del ADN (Panner Selvam et al., 2021; Wright et al., 2014). Como se mencionó en la introducción es muy importante para disminuir los niveles de fragmentación espermática evitar comidas con altos niveles de grasa, el tabaco, algunos medicamentos y la exposición a sustancias tóxicas, mientras que es favorable, el realizar actividad física, administrar suplementos vitamínicos con antioxidantes y consumir comida saludable (Yao et al., 2016).

Se debe considerar que el análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides no puede por sí solo predecir el fracaso en la concepción, ya que la infertilidad es un problema de la pareja, por lo cual también se debe considerar la fertilidad de la mujer. Más aún, una sola prueba de disfunción de gametos de un solo componente de la pareja no puede predecir el resultado del tratamiento de fertilidad (Rex et al., 2017).

Es importante destacar que un obstáculo para mejorar las técnicas de tratamiento de muestras de semen es la falta de conocimiento sobre la etiología de la fragmentación del ADN espermático. Por ello, una mejor comprensión de los procesos fisiopatológicos de la infertilidad masculina, se traducirá en el desarrollo de mejores herramientas de diagnóstico clínico. En el futuro se debe continuar la integración y validación de datos para el desarrollo de biomarcadores de infertilidad clínicamente útiles para ayudar en el diagnóstico, tratamiento y asesoramiento de la infertilidad masculina de manera más personalizada.

Como muestran numerosos autores, un punto destacable del sistema microfluídico es que se asemeja mucho al sistema natural de selección espermática en el tracto reproductor femenino en comparación con las técnicas convencionales (Parrella et al., 2019). Por ello, se presenta como el sistema mejor desarrollado para tratar muestras de semen y esto ha provocado que cada vez más laboratorios de andrología lo estén adoptando en la práctica habitual. Este hecho, ha contribuido a la validación del sistema microfluídico, la cual es un proceso continuo y dinámico que va adquiriendo consistencia en la medida que se reportan mayor número de

resultados obtenidos de los experimentos publicados. Es por esto que el presente trabajo suma conocimiento para realizar esta validación.

Finalmente, en futuros experimentos se tratará de comparar estos métodos de separación espermática para disminuir la fragmentación de semen descongelado. Este tipo de muestras de semen presentan un notable aumento en la fragmentación del ADN espermático producto de la técnica de congelamiento propiamente dicha (Riva et al., 2018). Por otra parte, existe otro campo de investigación muy interesante que es el de combinar las técnicas, por ejemplo, realizar un gradiente de densidad y luego utilizar el sistema microfluídico sobre la muestra obtenida o hacer lo mismo luego de swim-up.

CONCLUSIÓN

Como conclusión se puede decir que:

- Se ha comparado con éxito el efecto de las tres técnicas de separación de espermatozoides (gradiente de densidad, swim-up y sistema microfluídico) sobre los niveles de fragmentación del ADN espermático.
- Se ha demostrado que el gradiente de densidad es la técnica que provee muestras con mayor concentración espermática y movilidad progresiva, siendo ésta la técnica más adecuada para el procesamiento de semen para inseminación artificial.
- Se ha demostrado que la técnica de swim-up presenta una mayor disminución de la fragmentación del ADN espermático al compararlo con el gradiente de densidad.
- Se ha determinado que la técnica de separación espermática mediante sistema microfluídico es la más eficiente para reducir los niveles de fragmentación del ADN espermático, llevando los mismos a valores cercanos a 0%. Por ello, se la propone como la técnica más adecuada para procesar muestras de semen para tratamientos de alta complejidad: FIV o ICSI.
- Si bien la técnica de swim-up no sería la primera elección para procesar muestras de semen para alta complejidad, ha mostrado un buen nivel de eficacia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, A., Barbăroşie, C., Ambar, R., Finelli, R. (2020a). The Impact of Single- and Double-Strand DNA Breaks in Human Spermatozoa on Assisted Reproduction. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 3882.
2. Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., Shah, R. (2021). Male infertility. *Lancet* (London, England), 397(10271), 319–333.
3. Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., Cho, C. L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M. G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., Robert, K. A., Shah, R. (2020b). Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *The world journal of men's health*, 38(4), 412–471.
4. Agarwal A., Majzoub A., Esteves S. C., Ko, E., Ramasamy, R., Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol*. 5:935-950.
5. Agarwal, A., Panner Selvam, M. K., Baskaran, S., Cho, C. L. (2019). Sperm DNA damage and its impact on male reproductive health: a critical review for clinicians, reproductive professionals and researchers. *Expert review of molecular diagnostics*, 19(6), 443–457.
6. Aitken R. J. (2020). Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction* (Cambridge, England), 159(4), R189–R201.
7. Asghar, W., Velasco, V., Kingsley, J. L., Shoukat, M. S., Shafiee, H., Anchan, R. M., Mutter, G. L., Tüzel, E., Demirci, U. (2014). Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Advanced healthcare materials*, 3(10), 1671–1679.
8. Babakhanzadeh, E., Nazari, M., Ghasemifar, S., Khodadadian, A. (2020). Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *International journal of general medicine*, 13, 29–41.
9. Bieniek, J. M., Drabovich, A. P., Lo, K. C. (2016). Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian journal of andrology*, 18(3), 426–433.
10. Bono, M. J., & Reygaert, W. C. (2020). Urinary Tract Infection. In StatPearls. StatPearls Publishing.
11. Boomsma, C. M., Cohlen, B. J., Farquhar, C. (2019). Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *The Cochrane database of systematic reviews*, 10(10), CD004507.
12. Brown, T. R. (2010). Are there specific genetic defects affecting the male reproductive tract? What are the underlying molecular mechanisms?. B. Robaire P. Chan (Eds.). *The*

- American Society of Andrology* (2nd edition). Allen Press, Inc.
<https://www.andrologysociety.org>
13. Cannarella, R., Condorelli, R. A., Mongioì, L. M., La Vignera, S., Calogero, A. E. (2020). Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1728.
 14. Carvajal, A., Centeno, C., Watson, R., Martínez, M., Sanz Rubiales, Á. (2011). ¿Cómo validar un instrumento de medida de la salud?. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 34(1), 63-72.
 15. Carlson, B. M. (2019). Human embryology and developmental biology. *Elsevier eds.* p. 479.
 16. Casarini, L., Crépieux, P., Reiter, E., Lazzaretti, C., Paradiso, E., Rochira, V., Brigante, G., Santi, D., Simoni, M. (2020). FSH for the Treatment of Male Infertility. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2270.
 17. Cescon, M., Chianese, R., Tavares, R. S. (2020). Environmental Impact on Male (In)Fertility via Epigenetic Route. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 2520.
 18. Chan, P. (2010). Clinical male infertility: Epidemiology and basic evaluation. B. Robaire P. Chan (Eds.). *The American Society of Andrology* (2nd edition). Allen Press, Inc.
<https://www.andrologysociety.org>
 19. Chianese, R., Pierantoni, R. (2021). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(1), 92.
 20. Cissen, M., Wely, M. V., Scholten, I., Mansell, S., Bruin, J. P., Mol, B. W., Braat, D., Repping, S., Hamer, G. (2016). Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*, 11(11), e0165125.
 21. Colaco S, Sakkas D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 35:1953-1968.
 22. Corradi, P. F., Corradi, R. B., & Greene, L. W. (2016). Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *The Urologic clinics of North America*, 43(2), 151–162.
 23. De Gheselle, S., Deroose, A., Stevens, J., Hiel, M., Tilleman, K. (2020). A methodological validation of an easy one-step swimout semen preparation procedure for selecting DNA fragmentation-free spermatozoa for ICSI. *Andrologia*, 52(11), e13852.
 24. Domínguez-Fandos, D., Camejo, M. I., Balleascà, J. L., Oliva, R. (2007). Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(12), 1011–1018.
 25. Donkin, I., Barrès, R. (2018). Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Molecular metabolism*, 14, 1–11.

26. Dutta, S., Majzoub, A., Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab journal of urology*, 17(2), 87–97.
27. Esteves, S. C., Santi, D., Simoni, M. (2020). An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology*, 8(1), 53–81.
28. Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S., Sharma, R., Humaidan, P. (2021). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 53(2), e13874.
29. Fácio, C. L., Previato, L. F., Machado-Paula, L. A., Matheus, P. C., Araújo, E., Filho (2016). Comparison of two sperm processing techniques for low complexity assisted fertilization: sperm washing followed by swim-up and discontinuous density gradient centrifugation. *JBRA assisted reproduction*, 20(4), 206–211.
30. Fainberg, J., Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-670.
31. Gallo, A., Boni, R., Tosti, E. (2020). Gamete quality in a multistressor environment. *Environment international*, 138, 105627.
32. Gode, F., Gürbüz, A. S., Tamer, B., Pala, I., Isik, A. Z. (2020). The Effects of Microfluidic Sperm Sorting, Density Gradient and Swim-up Methods on Semen Oxidation Reduction Potential. *Urology journal*, 17(4), 397–401.
33. Goldstein, M. (2010). Why evaluate the infertile male in the era of ART?. B. Robaire P. Chan (Eds.). *The American Society of Andrology* (2nd edition). Allen Press, Inc. <https://www.andrologysociety.org>
34. Hales, F., Robaire, B. (2010). Can spermatozoa be targets for drugs? If so, what are the consequences of such drug exposures? Is there a need for pre-conception counselling for men?. B. Robaire P. Chan (Eds.). *The American Society of Andrology* (2nd edition). Allen Press, Inc. <https://www.andrologysociety.org>
35. Henkel R. (2012). Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian journal of andrology*, 14(2), 260–269.
36. Hodge, D., VerMilyea, T., O'Leary, R., Wittmier, S., Wen, A., Ringler, G., Baek, K., Marrs, R. (2019). Microfluidic sperm selection by the Zymot sperm separation device concentrates sperm with significantly less DNA damage for subsequent ART procedures. 10.13140/RG.2.2.24341.06880.
37. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 2000;21:33–44.
38. Jarvi K. (2020). High Sperm DNA Damage: Does Testicular Sperm Make Sense?. *The Urologic clinics of North America*, 47(2), 165–174.

39. Kamiński, P., Baszyński, J., Jerzak, I., Kavanagh, B. P., Nowacka-Chiari, E., Polanin, M., Szymański, M., Woźniak, A., Kozera, W. (2020). External and Genetic Conditions Determining Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5274.
40. Karimi Zarchi, M., Maleki, B., Dehghani Ashkezari, M., Motamed Zadeh, L., Agha-Rahimi, A. (2020). The Effects of In Vitro Incubation of Asthenoteratozoospermic Semen after Density Gradient Centrifugation at Room Temperature and 37°C on Sperm Parameters, Chromatin Quality and DNA Fragmentation in a Short Time Period. *Journal of Reproduction & Infertility*, 21(4), 275–282.
41. Kim G. Y. (2018). What should be done for men with sperm DNA fragmentation?. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 45(3), 101–109.
42. Mann, U., Shiff, B., & Patel, P. (2020). Reasons for worldwide decline in male fertility. *Current opinion in urology*, 30(3), 296–301.
43. Martínez E., Bezazián C., Bezazián A., Lindl K., Peliquero A., Cattaneo A., Gnocchi D., Irigoyen M., Tessari L., Martínez AG. Sperm DNA fragmentation and male age: results of in vitro fertilization treatments. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*. **Aprobado para publicación.**
44. Marzano, G., Chiriaco, M. S., Primiceri, E., Dell'Aquila, M. E., Ramalho-Santos, J., Zara, V., Ferramosca, A., Maruccio, G. (2020). Sperm selection in assisted reproduction: A review of established methods and cutting-edge possibilities. *Biotechnology advances*, 40, 107498.
45. Miller, D., Vukina, J. (2020). Recent advances in clinical diagnosis and treatment of male factor infertility. *Postgraduate medicine*, 132(sup4), 28–34.
46. Muratori, M., Forti, G., Baldi, E. (2008). Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(9), 785–787.
47. Noh, S., Go, A., Kim, D. B., Park, M., Jeon, H. W., Kim, B. (2020). Role of Antioxidant Natural Products in Management of Infertility: A Review of Their Medicinal Potential. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 957.
48. Nosrati, R., Graham, P. J., Zhang, B., Riordon, J., Lagunov, A., Hannam, T. G., Escobedo, C., Jarvi, K., Sinton, D. (2017). Microfluidics for sperm analysis and selection. *Nature reviews. Urology*, 14(12), 707–730.
49. Oseguera-López, I., Ruiz-Díaz, S., Ramos-Ibeas, P., Pérez-Cerezales, S. (2019). Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 298.
50. Ozcan, P., Takmaz, T., Yazici, M., Alagoz, O. A., Yesiladali, M., Sevket, O., Ficioglu, C. (2021). Does the use of microfluidic sperm sorting for the sperm selection improve in vitro fertilization success rates in male factor infertility?. *The journal of obstetrics and gynaecology research*, 47(1), 382–388.

51. Panner Selvam, M. K., Ambar, R. F., Agarwal, A., Henkel, R. (2021). Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrologia*, 53(1), e13706.
52. Paparella, C., Pavesi, A., Provenzal, O., Ombrella, A., Bouvet, B. (2017). Infertilidad masculina. Exposición laboral a factores ambientales y su efecto sobre la calidad seminal.. *Revista Uruguaya de Medicina Interna* , 2(2), 10-21.
53. Perrault, S. D. (2010). What are the effects of environmental toxicants and/or endocrine disruptors on sperm function?. B. Robaire P. Chan (Eds.). *The American Society of Andrology* (2nd edition). Allen Press, Inc. <https://www.andrologysociety.org>
54. Parrella, A., Keating, D., Cheung, S., Xie, P., Stewart, J. D., Rosenwaks, Z., Palermo, G. D. (2019). A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(10), 2057–2066.
55. Qiu, Y., Yang, H., Li, C., Xu, C. (2020). Progress in Research on Sperm DNA Fragmentation. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 26, e918746.
56. Quinn, M. M., Jalalian, L., Ribeiro, S., Ona, K., Demirci, U., Cedars, M. I., Rosen, M. P. (2018). Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(8), 1388–1393.
57. 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.
58. Rex, A. S., Aagaard, J., Fedder, J. (2017). DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology*, 5(4), 622–630.
59. Ribas-Maynou, J., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020). The Relationship between Sperm Oxidative Stress Alterations and IVF/ICSI Outcomes: A Systematic Review from Nonhuman Mammals. *Biology*, 9(7), 178.
60. Riva N.S., Ruhlmann C., Iazzo R.S., Marcial López C.A., Martínez A.G. (2018). Comparison of slow freezing with vitrification for human sperm cryopreservation. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, 22:331-337.
61. Samuel, R., Feng, H., Jafek, A., Despain, D., Jenkins, T., Gale, B. (2018). Microfluidic-based sperm sorting analysis for treatment of male infertility. *Translational andrology and urology*, 7(Suppl 3), S336–S347.
62. Schlegel, P. N. (2010). What are the assisted reproductive technologies for male infertility?. B. Robaire P. Chan (Eds.). *The American Society of Andrology* (2nd edition). Allen Press, Inc. <https://www.andrologysociety.org>
63. Sequeira, R. C., Criswell, T., Atala, A., Yoo, J. J. (2020). Microfluidic Systems for Assisted Reproductive Technologies: Advantages and Potential Applications. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 17(6), 787–800.

64. Shirota, K., Yotsumoto, F., Itoh, H., Obama, H., Hidaka, N., Nakajima, K., Miyamoto, S. (2016). Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertility and sterility*, 105(2), 315–21.e1.
65. Softness, K. A., Trussler, J. T., Carrasquillo, R. J. (2020). Advanced sperm testing. *Current opinion in urology*, 30(3), 290–295.
66. Štiavnická, M., Abril-Parreño, L., Nevoral, J., Králíčková, M., García-Álvarez, O. (2017). Non-Invasive Approaches to Epigenetic-Based Sperm Selection. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 23, 4677–4683.
67. Suarez, S. S., Wu, M. (2017). Microfluidic devices for the study of sperm migration. *Molecular human reproduction*, 23(4), 227–234.
68. Sun, H., Gong, T. T., Jiang, Y. T., Zhang, S., Zhao, Y. H., Wu, Q. J. (2019). Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging*, 11(23), 10952–10991.
69. Trasler, J. M. (2010). Are there epigenetic events associated with male germ cell formation? What is the role of genomic imprinting in male germ cells?. B. Robaire P. Chan (Eds.). *The American Society of Andrology* (2nd edition). Allen Press, Inc. <https://www.andrologysociety.org>
70. Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL. (2004). Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod*. 19:2103-2108.
71. Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62, 2–10.
72. Vaughan, D. A., Sakkas, D. (2019). Sperm selection methods in the 21st century. *Biology of reproduction*, 101(6), 1076–1082.
73. Wang, C. (2010). How does semen analysis assist in understanding the reproductive status of the male?. B. Robaire P. Chan (Eds.). *The American Society of Andrology* (2nd edition). Allen Press, Inc. <https://www.andrologysociety.org>
74. Wright, C., Milne, S., Leeson, H. (2014). Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 28(6), 684–703.
75. Yao, D. F., Mills, J. N. (2016). Male infertility: lifestyle factors and holistic, complementary, and alternative therapies. *Asian journal of andrology*, 18(3), 410–418.
76. Yetkinel, S., Kilicdag, E. B., Aytac, P. C., Haydardedeoglu, B., Simsek, E., Cok, T. (2019). Effects of the microfluidic chip technique in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection for unexplained infertility: a prospective, randomized controlled trial. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(3), 403–409.

77. Zambrano Serrano, C.A., Carvajal Obando, A. (2020). Diagnóstico y tratamiento hormonal de la infertilidad masculina. *Actas urológicas españolas*, 44(5), 321–327.
78. Zhang, J., Cai, Z., Ma, C., Xiong, J., Li, H. (2020). Impacts of Outdoor Air Pollution on Human Semen Quality: A Meta-Analysis and Systematic Review. *BioMed research international*, 2020, 7528901.
79. Zhang, Q., Fan, L., Li, F., Sun, Z., Zhang, C., Chen, R. (2020). Yishentongluo decoction in treatment of idiopathic asthenozoospermia infertility: Study protocol for a randomized controlled trial. *Medicine*, 99(43), e22662.
80. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. (2008) Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 23:2663-2668.

APÉNDICE

Datos recolectados en el Experimento 1.

EXPERIMENTO 1														
Nº	FRESCO						POST SWIM-UP (Vol: 400 µl)				POST GRADIENTE (Vol: 400 µl)			
	Volumen (ml)	Concentración (mill)	Spz totales (mill)	Progesivos (%)	Insitu (%)	Inmóviles (%)	Concentración (mill)	Progesivos (%)	Progesivos totales (%)	Fragmentación (%)	Concentración (mill)	Progesivos (%)	Progesivos totales (%)	Fragmentación (%)
1	2,8	86	240,8	53	4	43	70	95	26,6	16	40	100	16	10
2	2,3	36	82,8	56	3	41	50	90	18	20	30	95	11,4	11
3	2,7	49	132,3	35	5	60	30	95	11,4	16	20	100	8	8
4	2,1	38	79,8	31	2	67	40	90	14,4	13	30	95	11,4	9
5	1,5	78	117	49	4	47	60	95	22,8	15	20	100	8	7
6	2,2	97	213,4	59	4	37	80	95	30,4	14	30	100	12	9
7	2,5	65	162,5	59	3	38	100	90	36	16	50	95	19	10
8	3,5	37	129,5	49	2	49	40	90	14,4	12	30	95	11,4	8
9	2,9	22	63,8	57	3	40	30	90	10,8	10	20	95	7,6	9
10	2,7	56	151,2	46	1	53	90	90	32,4	13	40	95	15,2	8
11	4,1	74	303,4	63	2	35	50	90	18	21	30	95	11,4	13
12	3,1	96	297,6	37	2	61	30	95	11,4	22	20	100	8	13
13	3,1	72	223,2	39	1	60	40	90	14,4	14	30	95	11,4	6
14	2,8	61	170,8	53	2	45	50	100	20	21	30	100	12	7
15	3,5	43	150,5	53	3	44	40	95	15,2	28	30	100	12	8
16	3,2	52	166,4	49	4	47	90	100	36	23	50	100	20	12
17	2,1	78	163,8	42	2	56	40	95	15,2	28	30	100	12	7
18	1,5	39	58,5	28	3	69	60	95	22,8	19	30	100	12	10
19	2,5	83	207,5	53	1	46	70	100	28	24	30	100	12	9
20	3,7	87	321,9	55	1	44	80	100	32	22	40	100	16	8
21	3,9	37	144,3	42	3	55	80	95	30,4	21	40	100	16	8
22	3,3	87	287,1	56	2	42	100	100	40	20	30	100	12	12
23	4,1	52	213,2	38	2	60	80	100	32	26	40	100	16	9
24	3,1	82	254,2	53	1	46	80	100	32	24	30	100	12	8
25	3,2	69	220,8	52	4	44	90	100	36	23	40	100	16	9

Datos recolectados en el Experimento 2.

EXPERIMENTO 2															
N°	FRESCO							POST SWIM-UP (Vol: 850 µl)				POST ZYMÖT (Vol: 850 µl)			
	Vol. (ml)	Concentración (mill)	Spz totales (mill)	Progesivos (%)	Insitu (%)	Inmóviles (%)	Fragmentación (%)	Concentración (mill)	Progesivos (%)	Progesivos totales (%)	Fragmentación (%)	Concentración (mill)	Progesivos (%)	Progesivos totales (%)	Fragmentación (%)
1	1,8	93	167,4	22	1	77	23	20	100	17,0	9	3	100	2,6	1
2	3,2	110	352,0	42	2	56	21	35	95	8,5	11	10	100	8,5	2
3	2,8	130	364,0	35	1	64	30	25	100	8,5	4	10	100	8,5	1
4	2,8	125	350,0	38	1	61	27	50	95	12,8	7	25	100	21,3	1
5	1,8	20	36,0	12	2	86	24	8	100	17,0	9	1	100	0,9	1
6	3,8	108	410,4	41	1	58	23	40	100	17,0	10	20	100	17,0	1
7	2,8	150	420,0	16	1	83	28	10	95	17,0	8	1	100	0,9	1
8	3,2	116	371,2	48	1	51	29	15	95	12,8	8	10	100	8,5	1
9	2,5	115	287,5	42	1	57	30	10	95	8,5	11	5	100	4,3	3
10	2,9	115	333,5	39	1	60	23	20	95	17,0	8	15	100	12,8	1
11	2,5	110	275,0	51	2	47	25	15	95	12,8	11	10	100	8,5	1
12	2,4	108	259,2	52	1	47	26	10	100	8,5	12	5	100	4,3	1
13	3,2	108	345,6	42	1	57	25	10	95	8,5	11	10	100	8,5	1
14	3,1	106	328,6	42	2	56	24	15	100	12,8	11	5	100	4,3	1
15	3,1	102	316,2	37	3	60	24	15	100	12,8	9	8	100	6,8	1
16	2,8	100	280,0	39	1	60	27	20	100	17,0	8	15	100	12,8	1
17	2,5	100	250,0	35	1	64	26	15	100	12,8	7	10	100	8,5	3
18	2,5	100	250,0	42	1	57	29	20	100	17,0	11	20	100	17,0	1
19	2,7	93	251,1	37	1	62	26	20	100	17,0	8	15	100	12,8	1