



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Efecto de la temperatura de desvitrificación en la capacidad
fecundante de los espermatozoides humanos

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGA

PRESENTA:
Isabel Méndez Ponce

TUTORA: Rosalina María de Lourdes Reyes Luna



Mayo 2014

Agradecimientos

A mi madre Elvira Ponce China, que con gran esfuerzo me di un gran apoyo económico

A mi hermano Eladio Méndez Ponce, con su apoyo incondicional, logre salir adelante.

A la doctora Rosalina María de Lourdes Reyes Luna, por sus enseñanzas, consejos y paciencia me llevo a la conclusión de la tesis profesional.

Al doctor Juan Carlos Flores Alonso y la doctora María Luisa Sánchez Vázquez por sus críticas constructivas y la contribución durante el desarrollo de la tesis.

Al ingeniero Sergio Alejandro Espinosa Morales por ser uno de los mejores como docente y tutor en mi formación profesional, un excelente amigo en quien confiar y a quien pedirle un buen consejo.

A mis compañeros de laboratorio: Luis Antonio, Alma, Esteban, Pamela, Francisco por enseñarme y darme consejos durante el desarrollo del experimento de tesis.

A mis amigos y amigas de la escuela: Eleyne, Norma, Israel, Miguel, Paulina, Jesus, Dulce María, Cecilia, Elsa, que fueron parte de mi formación y seguirán siendo parte de mi vida.

A todos mis hermanos y hermana: Fernando, Juan, Eladio, Antonio, Irma, a mi cuñada Gasuri, a todos ellos por creer en mí.

A mis amigos: Felipe Fernando, Agustín Ortega, Daniel Méndez, que han sido parte de mi formación como persona, han sido parte de mi vida y que me han brindado su apoyo incondicional.

Dedicatorias

A mis padres: Nicolás Méndez Juárez y Elvira Ponce China, en especial a mi madre que con sus ánimos y apoyo hoy logro un objetivo más en mi vida.

Dedico en especial este trabajo en memoria de mi hermano Fernando Pedro Méndez Ponce, que en vida me lleno de ánimos y estuvo muy orgulloso de mi.

A mi hermano Eladio Méndez Ponce que me enseñó a seguir mis sueños y fue un modelo a seguir

A mis abuelos, especialmente a mi abuelo Juan Ponce Salas, porque siempre ha sido un gran ejemplo en mi familia.

A mis hermosas sobrinas Mayra, Jaquelin, Linda, Maribel, Lizbeth y a mi sobrino Jonathan.

Al Ingeniero Sergio por su tiempo y espacio que me brindo durante mi estancia en la universidad.

Índice

Introducción	1
Antecedentes	27
Justificación	32
Hipótesis	34
Objetivo general	35
Objetivos particulares	35
Material y métodos	36
Resultados	47
Discusión	54
Conclusión	58
Perspectivas	59
Bibliografía	60
Anexos	65

Resumen

Los espermatozoides humanos, en la actualidad, pueden ser criopreservados mediante la adición de crioprotectores a base de yema de huevo, para su conservación y uso en fertilizaciones futuras mediante técnicas de reproducción asistida. En la actualidad el estilo de vida, las enfermedades, el uso de sustancias nocivas para la salud y la mala alimentación han contribuido en la presencia de problemas en reproducción. Por lo cual el objetivo de este trabajo es criopreservar espermatozoides humanos capacitados por la técnica de vitrificación rápida y determinar la temperatura óptima de desvitrificación para recuperar movilidad y viabilidad celular. El método de la vitrificación rápida en espermatozoides humanos se basa en someter a las células a vapores de nitrógeno líquido (N_2 L), evitar la formación de cristales por medio de un crioprotector y recuperar la capacidad fertilizante de estas células después de la desvitrificación. Se realizaron 40 espermatobioscopias de semen humano normospermicas y se dividieron en dos grupos: muestras espermáticas sin capacitar ($n=20$), que fueron vitrificadas posteriormente de la espermatobioscopia y muestras espermáticas previamente capacitadas, antes de ser sometidas a vitrificación, por la técnica de swim up ($n=20$). Para la vitrificación, se le adiciono a las muestras espermáticas, un crioprotector a base de yema de huevo en una concentración 1:1, cada muestra fue vitrificada en vapores de N_2 (L) en forma de perlas y fueron almacenadas durante 3 meses. Posteriormente para la desvitrificación, se realizó en baño maría a tres diferentes temperaturas: 37, 40 y 60°C para ambos grupos, adicionando a cada muestra HTF. En este estudio el porcentaje de la recuperación en la movilidad total de espermatozoides capacitados y sin capacitar que fueron vitrificados y desvitrificados a las temperaturas de 37°C fue de 36.20 vs 37.48; 40°C. 40.45 vs 41.18 y 60°C 34.85 vs 48.65 respectivamente. La movilidad se ve disminuida después de la desvitrificación hasta en un 40% y presentaron diferencias significativas al comparar los promedios de las tres diferentes temperaturas utilizadas contra el promedio obtenido en el control. La recuperación de la viabilidad celular en los grupos capacitados y sin capacitar, se mantuvo y no presento diferencias significativas al comparar los valores obtenidos en las tres

diferentes temperaturas ni con el control. Esto nos dice que la vitrificación de espermatozoides humanos afecta su movilidad celular en la misma proporción como ha sido reportada en la literatura cuando se desvitrifican los espermatozoides capacitados a 60°C, sin embargo la viabilidad celular se mantiene igual que el control. En base a los resultados se concluye que el método de vitrificación rápida de espermatozoides y emplear yema de huevo como crioprotector es una buena herramienta para emplearse en la criopreservación de espermatozoides humanos que serán utilizados en las técnicas de reproducción de alta complejidad como el FIV y el ICSI.

**Efecto de la temperatura de desvitrificación en la capacidad
fecundante de los espermatozoides Humanos**

Introducción

La reproducción es la capacidad que los seres vivos tienen para perpetuarse y dar lugar a su descendencia, lo cual constituye una función básica de todo organismo con mecanismo de reproducción sexual

Cada organismo que se reproduce sexualmente tiene dos tipos de células: células somáticas y células germinales. Las células germinales, durante el desarrollo embrionario, son las precursoras de los gametos, los cuales contribuyen a la formación de nuevas generaciones, todas las otras células corporales son células somáticas, las cuales son responsables del crecimiento y diferenciación física.

Las células humanas nucleadas contienen 46 cromosomas (23 pares), 22 autosomas y un par de cromosomas sexuales. Este es el estado diploide encontrado en todas las células somáticas. Las células germinales, como los espermatozoides y los ovocitos, contienen solo 23 cromosomas y son, por lo tanto, haploides. Cuando 2 gametos se unen durante la fecundación, cada gameto haploide contribuye con la constitución diploide del embrión. Debido a que la hembra tiene dos cromosomas X, el ovocito haploide necesariamente tiene un cromosoma X sencillo. El espermatozoide contribuye con un cromosoma X o Y para integrarse al embrión y todas las 4 células, derivadas del precursor diploide mediante la meiosis, son funcionales (Palacios, 2009).

Para la reproducción sexual, se llevan a cabo dos importantes eventos llamados *gametogénesis*, en la mujer ovogénesis y en el hombre espermatogénesis y espermiogénesis.

Si bien es importante mencionar que todos estos cambios que implican la diferenciación y maduración de un gameto masculino, se llevan a cabo en el sistema reproductor masculino, el cual está formado por: órganos genitales externos, órganos genitales internos, glándulas genitales auxiliares y también de

las funciones fisiológicas endocrinas, como a continuación se describe (Sellés y cols., 2012).

Sistema Reproductor Masculino

Como el gameto masculino es tan importante para la reproducción, sin hacer de menor importancia al ovocito, para el proceso reproductivo es sin duda uno de los eventos más complejos, pero al mismo tiempo más fascinante de la naturaleza, pues representa para cada individuo la posibilidad de perpetuarse a través de sus descendientes, por esta razón es importante describir detalladamente las partes que conforma el sistema reproductor masculino y sus funciones que desempeña cada una de ellas (ver fig. 1).

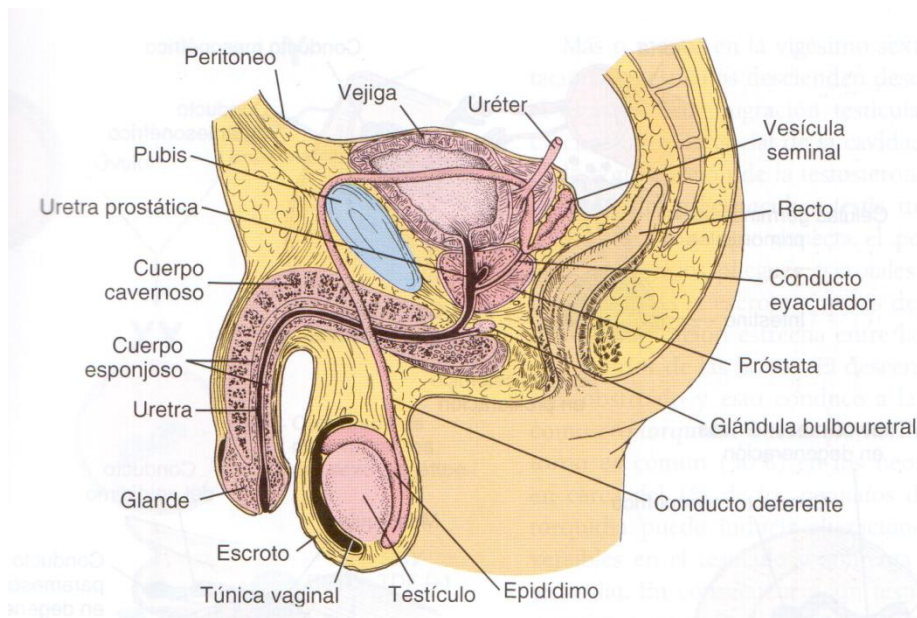


Figura 1. Estructura del Sistema Reproductor Masculino (Según Ross y Pawlina., 2009)

Órganos Genitales Externos

Dentro de los órganos genitales externos se encuentran: Los testículos, el escroto y pene.

Testículos: Son dos glándulas ovoides, una a cada lado del pene, de unos 5 cm de largo y 2.5 cm de diámetro y con un peso de 10-15 gr, que están suspendidos dentro del escroto por el cordón espermático. A su vez, dentro de los testículos se

encuentra una estructura muy importante y nos referimos a los epidídimos en los cuales son producidos los espermatozoides.

Los testículos producen las células germinales masculinas o espermatozoides y las hormonas sexuales masculinas o andrógenos. Constituyen las gónadas masculinas y tienen el mismo origen embriológico que los ovarios o gónadas femeninas (Sellés y cols., 2012).

En el interior de cada testículo contiene túbulos muy flexibles, los túbulos seminíferos, en forma de arco con ambos extremos conectados en la zona del mediastino testicular donde forman parte de una red de tubos anastomosados formados por un epitelio cúbico simple, mejor conocido como rete testis que conectan con el epidídimo.

Los túbulos seminíferos contienen dos tipos de células, las células espermátogénicas y el tejido conjuntivo.

Las células espermátogénicas que darán origen a los espermatozoides y las células de Sertoli encargadas del mantenimiento del proceso de formación de espermatozoides o espermátogénesis.

En el tejido conjuntivo situado en los espacios que separan a los túbulos seminíferos adyacentes, hay grupos de células llamadas células de Leydig que secretan el andrógeno más importante, la testosterona, es secretada desde la fase embrionaria hasta el final de la vida, necesaria para el desarrollo normal de las gónadas en el feto masculino, que pasa a un periodo de inactividad al 5to mes de desarrollo embrionario que se recupera en la pubertad (Sellés y cols., 2012).

Epidídimos: son dos estructuras en forma de coma de unos 4 cm de longitud, cada una de las cuales se encuentra adosada a las superficies superior y posterior-lateral de cada testículo. Cada epidídimo tiene un cuerpo que consiste en el conducto del epidídimo que está muy contorneado y en donde los espermatozoides son almacenados para pasar las etapas finales de su maduración, y una cola o cola del epidídimo que se continúa con el conducto

deferente que transporta el espermatozoide hacia el conducto eyaculador para su expulsión hacia la uretra. El epidídimo ayuda a expulsar los espermatozoides hacia el conducto deferente durante la excitación sexual por medio de contracciones peristálticas del músculo liso de su pared. Los espermatozoides pueden permanecer almacenados y viables en el epidídimo (Sellés y cols., 2012).

Escroto: Es un saco cutáneo exterior que contiene los testículos y está situado postero-inferiormente en relación al pene, consta de Piel rugosa de color oscuro y Fascia superficial o lámina de tejido conjuntivo. Esta Fascia superficial, contiene una hoja de músculo liso con el nombre de músculo dartos cuyas fibras musculares están unidas a la piel y cuya contracción produce arrugas en la piel del escroto. La fascia superficial forma un tabique incompleto que divide al escroto en una mitad derecha y otra izquierda y cada una de ellas contiene un testículo.

Asociado a cada testículo dentro del escroto, se encuentra el músculo cremáster que es una pequeña banda de músculo estriado esquelético que continúa al músculo oblicuo menor o interno al abdomen. La localización exterior del escroto y la contracción de sus fibras musculares regulan la temperatura de los testículos porque la producción normal de espermatozoides requiere una temperatura inferior en unos 2-3 grados a la temperatura corporal. En respuesta a las bajas temperaturas el músculo dartos se contrae con lo que se arruga la piel del escroto y se reduce la pérdida de calor y el músculo cremáster en cada lado también se contrae con lo que los testículos son acercados al cuerpo para estar cerca del calor corporal (Sellés y cols., 2012).

Pene: Es el órgano de la copulación en el hombre (ver fig. 2), sirve de salida común para la orina y el semen o líquido seminal, consiste en Cuerpo del pene y Raíz del pene.

El Cuerpo del pene: es la parte pendular libre, cubierta por piel muy fina, de color oscuro y poco adherida. Está compuesto por tres cuerpos cilíndricos de tejido cavernoso eréctil, encerrados en una capsula fibrosa. Dos de los cuerpos eréctiles que son los cuerpos cavernosos, están situados a ambos lados del pene. El otro

cuerpo eréctil que es el cuerpo esponjoso, se encuentra anteriormente en el pene, en el plano medio, contiene la uretra esponjosa y la mantiene abierta durante la eyaculación. El dorso del pene se encuentra en posición anterior cuando el pene está flácido y su superficie anterior mira hacia atrás. Los cuerpos cavernosos están fusionados uno con otro en el plano medio y en la parte posterior se separan y forman los dos pilares que sostienen el cuerpo esponjoso que se encuentra entre ellos como se muestra en la fig 2 (Sellés y cols., 2012).

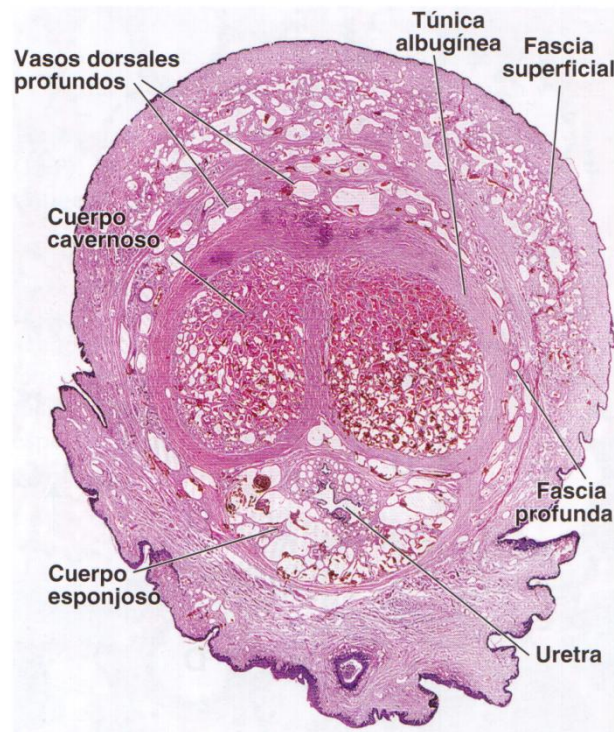


Figura 2. Estructura del pene (Según Ross y Pawlina, 2009)

La Raíz del pene: es la parte superior de sujeción del pene y contiene los dos pilares que se insertan a cada lado del arco púbico. Cada pilar del pene está rodeado por el músculo isquiocavernoso, el bulbo del pene es la porción ensanchada de la base del cuerpo esponjoso por donde penetra la uretra esponjosa en el cuerpo esponjoso, y está unido a los músculos profundos del periné. La contracción de todos estos músculos esqueléticos permite la eyaculación. El peso del cuerpo del pene está sostenido por dos ligamentos que los sujetan a la superficie anterior de la sínfisis del pubis.

En la punta del pene, el cuerpo esponjoso forma el glande que cubre los extremos libres de los cuerpos cavernosos. Cerca del extremo final del glande se encuentra el orificio de la uretra esponjosa u orificio externo de la uretra. La piel y las fascias del pene se prolongan como una doble capa de piel dando lugar al prepucio, que cubre el glande en una extensión variable.

El tejido eréctil de los cuerpos cavernosos y del cuerpo esponjoso consiste en unos espacios venosos entrelazados e intercomunicados entre sí. Cuando se produce excitación sexual, las fibras nerviosas parasimpáticas, que provienen de la medula espinal sacra, estimulan la producción y liberación del óxido nítrico (N_2O_5) que provoca la relajación del musculo liso de las arteriolas que proporcionan sangre a estos espacios venosos y como consecuencia la sangre fluye y los llena, de modo que los cuerpos cavernosos se agrandan y se vuelven rígidos, y el pene se pone en erección. El cuerpo esponjoso no se vuelve tan rígido como los cuerpos cavernosos y por lo tanto, la uretra esponjosa permanece abierta permitiendo el paso del semen durante la eyaculación (Sellés y cols., 2012).

Una vez que la excitación sexual termina, el pene retorna a su estado de flacidez, debido a la estimulación de las fibras nerviosas simpáticas que dan lugar a la contracción del musculo liso de esas arteriolas que entonces se cierran y ya no llega tanta sangre al tejido eréctil y el exceso de sangre ya existente es vaciado lentamente a la circulación venosa (Reiriz, 2011).

Los órganos genitales internos

Conductos Eyaculadores: cada uno de los conductos eyaculadores es un tubo delgado, mide de 2- 2,5 cm. de longitud y se forma cerca del cuello de la vejiga por la unión del conducto de la vesícula seminal y el conducto deferente de su lado. Ambos conductos eyaculadores viajan juntos a medida que pasan a través de la próstata y van a desembocar en la uretra prostática. Todos los conductos del testículo convergen en una estructura llamada red de Haller o “rete testi”, llamados conductos deferentes y conductos eferentes (Sellés y cols., 2012).

C. Deferentes: son dos tubos musculares de pared gruesa que comienzan en la cola del epidídimo de cada lado y terminan en el conducto eyaculador de su lado. El conducto deferente de cada lado asciende dentro del cordón espermático o estructura de sostén del aparato reproductor masculino que asciende desde el escroto, pasa al interior de la pelvis.

C. Eferente: son pequeños conductos que llevan los espermatozoides al epidídimo. Cruza el uréter y viajan entre el uréter y el peritoneo, después se une con el conducto de la vesícula seminal de su lado para formar el conducto eyaculador.

El conducto deferente transporta los espermatozoides durante la excitación sexual, desde el epidídimo hasta el conducto eyaculador, en su camino hacia la uretra, por medio de contracciones peristálticas de su pared de musculo liso. Igual que sucede con el epidídimo, el conducto deferente puede almacenar espermatozoides durante meses (Sellés y cols., 2012).

Vesículas Seminales: son dos largos tubos de unos 15 cm. De longitud que están enrollados y forman unas estructuras ovaladas en la base de la vejiga, por delante del recto, sería más apropiado llamarlas glándulas seminales ya que producen una secreción espesa y alcalina que contiene fructosa, prostaglandinas y diversas proteínas, que se mezcla con el esperma a medida que este pasa a lo largo de los conductos eyaculadores (ver fig. 3). El conducto de cada vesícula seminal se une con el conducto deferente de su lado para formar el conducto eyaculador (Reiriz, 2011).

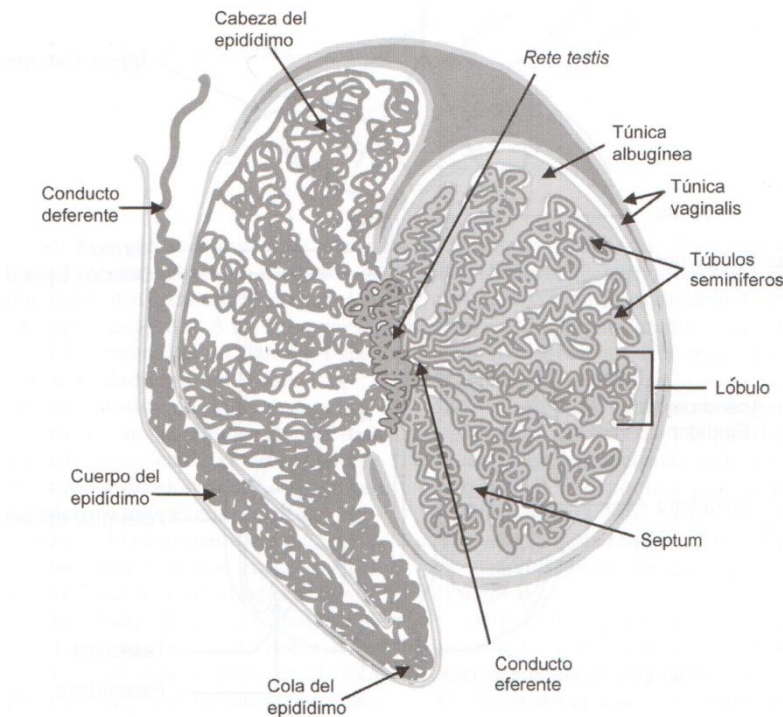


Figura 3. Órganos genitales internos (Pérez, 2011)

Órganos genitales auxiliares

Próstata: es la mayor glándula accesoria del sistema reproductor masculino con un tamaño similar al de una pelota de golf, se sitúa en la pelvis por debajo de la vejiga urinaria y detrás de la sínfisis del pubis y rodea la primera porción de la uretra que por ello se llama uretra prostática (ver fig. 4). Crece lentamente desde el nacimiento hasta la pubertad, luego se expande hasta los 30 años y permanece estable hasta los 45 años. A partir de esa edad, puede agrandarse y ocasionar molestias. La uretra prostática y los conductos eyaculadores pasan a través de la próstata dividiéndola en lóbulos.

Existen de 20-30 conductillos prostáticos que desembocan en la pared posterior de la uretra prostática, ya que la mayor parte del tejido glandular se localiza posterior y lateral a la uretra prostática y por esos conductos se descarga la secreción prostática hacia la uretra y se añade el líquido seminal. El líquido prostático es lechoso y levemente ácido y contiene ácido cítrico, enzimas

proteolíticas y sustancias antibióticas que contribuyen a disminuir el crecimiento de bacterias en el semen y el aparato reproductor femenino (Sellés y cols., 2012).

Glándulas Bulbouretrales: son dos pequeñas glándulas situadas posteriormente a la próstata, también reciben el nombre de glándulas Cowper. Se encuentran debajo de la próstata, postero-laterales en relación a la uretra membranosa. Sus conductos (2-3 cm.) se abren en la porción superior de la uretra esponjosa. Durante la excitación sexual secretan un líquido alcalino al interior de la uretra que protege a los espermatozoides, neutralizando la acidez de la uretra y moco que lubrica al extremo del pene y las paredes de la uretra, disminuyendo el número de espermatozoides que resultan dañados por la eyaculación (Sellés y cols., 2012).

Uretra Masculina: es un tubo muscular que transporta la orina y el semen hasta el orificio externo de la uretra o meato uretral, localizado en el extremo del glande, la uretra masculina se divide en tres partes:

- Uretra prostática: tiene unos 3 cm. de longitud y comienza en el orificio interno de la uretra, en el trigono de la vejiga. Desciende a través de la glándula prostática y en su pared posterior desembocan los conductos de la glándula prostática y los conductos eyaculadores.
- Uretra membranosa es la porción más corta de la uretra con 1 cm. de longitud aproximadamente y está rodeada por el esfínter uretral y a cada lado se encuentra una glándula bulbouretral.
- La uretra Esponjosa: es la porción más larga de la uretra con unos 15 cm. de longitud y atraviesa toda la longitud del pene. Termina en el orificio externo de la uretra que comunica con el exterior y es la porción más estrecha y menos distensible de la uretra con un diámetro aproximado de unos 5 mm. En la parte superior de esta uretra desembocan los conductos de las glándulas bulbouretrales (sellés y cols., 2012).

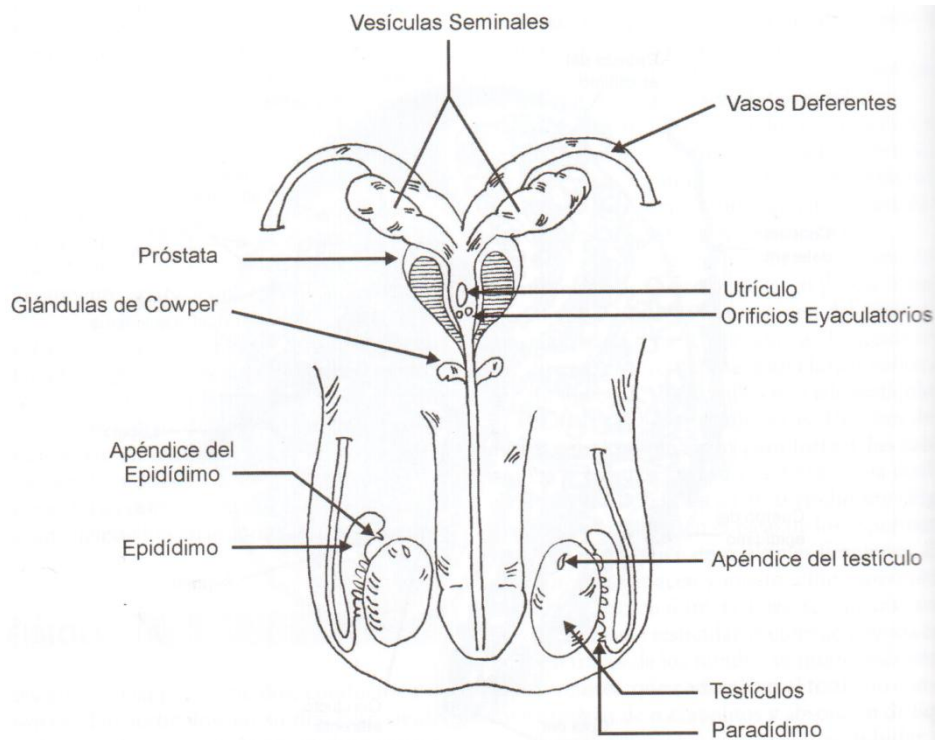


Figura 4. Esquema de órganos genitales auxiliares (Pérez, 2011)

Funciones Fisiológicas Endocrinas

Las funciones fisiológicas endocrinas del sistema reproductor masculino son: **La espermatogénesis, la espermiogénesis (anteriormente descritas), estructura funcional del espermatozoide y función endocrina de los testículos y hormonas en el sistema reproductor masculino.**

El semen: es una mezcla de componentes producidas por varias glándulas diferentes, estos son mezclados durante la eyaculación incompleta y, por lo tanto, el eyaculado inicial no es una mezcla totalmente homogénea. La primera porción de la eyaculación, aproximadamente el 5%, se componen de las secreciones de la Cowper (bulbouretral) y glándulas littré. La segunda porción se deriva de la próstata y contribuye del 15 al 30%. Siguen pequeñas contribuciones de la ampolla y el epidídimo y, finalmente, de las vesículas seminales, que contribuyen el resto y de la mayoría de la eyaculación (Owen and Katz, 2005).

Las secreciones de los órganos que contribuyen a la eyaculación difieren en su composición y ha habido un gran interés en la evaluación de su composición. La próstata es la principal fuente de la fosfatasa ácida y neutra, el ácido cítrico, el inositol, calcio, zinc y magnesio encontrado en el eyaculado. La contribución de las vesículas seminales es rica en fructosa, ácido ascórbico, y las prostaglandinas, mientras que las concentraciones de L-carnitina y alfa glucosidasa neutral son indicaciones de la función del epidídimo. Una pequeña parte de la fructosa presente es originada a partir de los ductos deferentes (Pérez, 2011).

Función endocrina de los testículos

La función principal de los testículos es la espermatogénesis pero también es un órgano endocrino cuyas células de Leydig producen y secretan la hormona testosterona que es un andrógeno y la principal hormona masculina, aunque también se secretan otros andrógenos como la dihidroandrosterona (DHA) y la androstenediona, en los cuales las funciones de la testosterona son:

- 1) La testosterona interviene en el desarrollo embrionario del aparato genital externo masculino.

La información genética presente en las células fetales, controla el desarrollo gonadal. Las gónadas se desarrollan, bajo el control genético, a partir de la gónada primordial. Inicialmente esta gónada primordial, se divide en una parte externa y una parte interna, iguales para ambos sexos (hombre y mujer). En el hombre, la parte interna dará al testículo, en la mujer la parte externa es la parte externa la que se desarrolla y da lugar al ovario. Una vez formados, formados los testículos comienzan a producir testosterona, la cual influye sobre desarrollo ulterior del aparato reproductor fetal. Para que se desarrolle el aparato genital externo del hombre, solo se requiere testosterona.

- 2) La testosterona mantiene la espermatogénesis, actuando sobre receptores situados en las células de Sertoli.

La testosterona es incapaz de iniciar la espermatogénesis por sí sola. Controla la velocidad y el mantenimiento de la espermatogénesis actuando sobre las células de Sertoli, pero solamente cuando éstas ya ha tenido lugar la acción de la hormona folículo estimulante (FSH) de la adenohipófisis.

- 3) La testosterona es responsable de diversas características del sexo masculino, como algunos aspectos del comportamiento, mayor masa muscular, modificaciones de la laringe, también del desarrollo de las glándulas accesorias del tracto reproductor masculino, que a su vez contribuyen al líbido o impulso sexual.

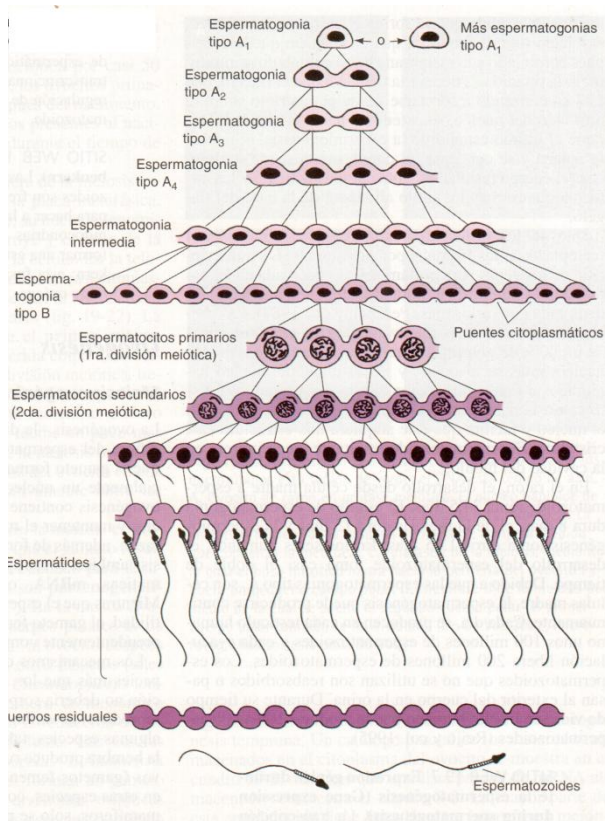
Los andrógenos son inactivados en el hígado y en los productos resultantes de su degradación son eliminados por la orina.

La eyaculación: es la liberación brusca de semen desde la uretra al exterior debido a un reflejo simpático coordinado por la región lumbar de la médula espinal. Como parte de ese reflejo, el esfínter del músculo liso situado en la base de la vejiga urinaria se cierra, evitando que la orina sea expulsada durante la eyaculación y que el semen ingrese en la vejiga urinaria. Antes de que se produzca la eyaculación, las contracciones peristálticas del epidídimo, del conducto deferente, de las vesículas seminales, de los conductos eyaculadores y de la próstata impulsan el semen a la uretra esponjosa lo que produce la emisión de un pequeño volumen de semen antes de la eyaculación. Esta emisión también puede ocurrir durante el sueño (polución nocturna).

La célula germinal masculina se produce en la gónada (testículo) mediante un proceso permanente de las células germinales o espermatogonias. A este proceso de división meiótica se le denomina espermatogénesis.

Espermatogénesis

En el embrión masculino, las células primordiales migran al testículo y entran en



un estado de hibernación hasta la pubertad. En la pubertad, las células germinales masculinas situadas en los testículos o gónadas masculinas, debido a la influencia de la testosterona y otras hormonas, se activan y dan lugar al comienzo de la espermatogénesis o formación de los espermatozoides (Velázquez, 2009). La espermatogénesis o formación de los espermatozoides, tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos en donde se encuentran las células germinales en diversas fases de desarrollo.

Figura 5. Espermatogénesis en Humano. (Según Bloom y Fawcett, 1975)

Las células germinales como se muestran en la fig. 5, son células indiferenciadas que se multiplican por mitosis y contienen 46 cromosomas llamadas **espermatogonias**.

Cada espermatogonia aumenta de tamaño y se convierte en un espermatocito primario que sigue teniendo 46 cromosomas, al dividirse da lugar a dos espermatocitos secundarios, cada uno de los cuales tiene ya 23 cromosomas, es decir, la mitad de la dotación genética de una célula normal.

De cada espermatocito secundario se originan dos células hijas llamadas espermátides que también contienen 23 cromosomas como se muestra en la fig. 5. Por último, se produce la transformación de cada una de las espermátides en un espermatozoide. Se necesitan aproximadamente dos meses para formar un

espermatozoide a partir de un espermatocono primario y este proceso solo ocurre a temperaturas inferiores a la del cuerpo humano. Por esta razón los testículos están alojados en el escroto, fuera de la cavidad abdominal. Cada día, alrededor de 300 millones de espermatozoides completan el proceso de espermatogénesis.

En la pared de los tubos seminíferos, como se muestra en la fig. 6, se encuentran las células de **Sertoli** que proporcionan un soporte mecánico y metabólico a los espermatozoides y en el tejido conjuntivo situado entre los túbulos seminíferos se encuentran las células de **Leydig**, que son las encargadas de secretar la hormona testosterona.

El proceso de división denominado espermatogénesis está controlado hormonalmente por el eje hipófisis-hipotálamo-gónada.

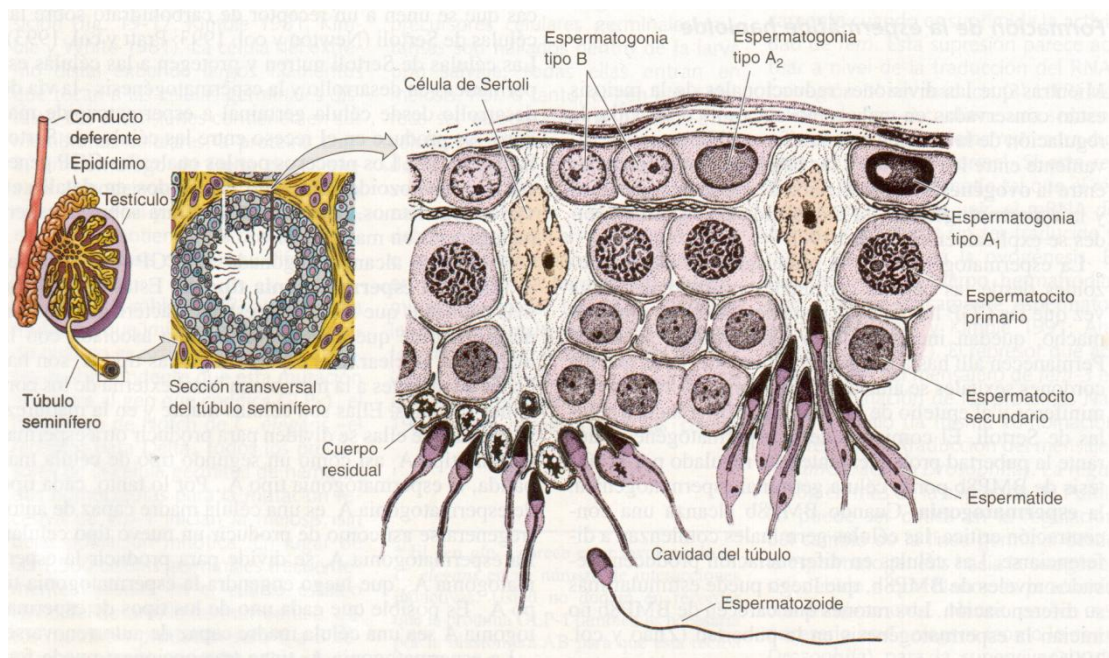


Figura 6. Producción de espermatozoides en los conductos seminíferos del testículo. (Según Dym, 1977)

Vía de señalización de eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo

En las regiones preópticas y mediobasal del hipotálamo como se muestra en la fig 7, se secretan: GnRH deca péptido conocido como factor liberador de gonadotropinas, Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) son las gonadotropinas primarias que activan la función testicular, tanto en la producción de andrógenos como en la regulación de la espermatogénesis y son secretadas por la mismas células basofílicas de la hipófisis. Ambas gonadotropinas son glicoproteínas compuestas por dos cadenas de polipéptidos denominados α y β . Las subunidades α son similares en ambas hormonas y las subunidades β diferentes estructural e inmunológicamente; además son las que definen la modalidad de acción en las células blanco testiculares. Las estructuras de las subunidades β son similares entre la LH y la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG). La GnRH interactúa con receptores de membrana, de alta afinidad, acoplados a proteínas G en las células gonadotropas. Su administración aguda estimula la liberación de LH y FSH mediante mecanismos mediados por calcio o fosfoinositidos como segundos mensajeros y, a largo plazo, el efecto lleva a estimular la síntesis de gonadotropinas.

La LH actúa sobre la membrana de las células de Leydig mediante un receptor miembro de la superfamilia de proteínas de proteínas G acopladas. La unión al receptor activa señales de traducción mediante el AMP cíclico y el sistema inositol trifosfato y fosfolipasa C. Esta activación llevará a estimular la síntesis de enzimas necesarias para la producción de testosterona.

El sitio primario de acción de la FSH es la membrana de la célula de Sertoli, en la cual la hormona se une a su receptor, miembro también de la familia de proteínas G acopladas.

El segundo mensajero es el AMP cíclico de manera similar a la LH y su activación conduce a la síntesis de varias proteínas como la aromatasa, que convierte testosterona en estradiol y la proteína legadora de andrógenos (ABP), encargada de distribuir la testosterona en el túbulo seminífero.

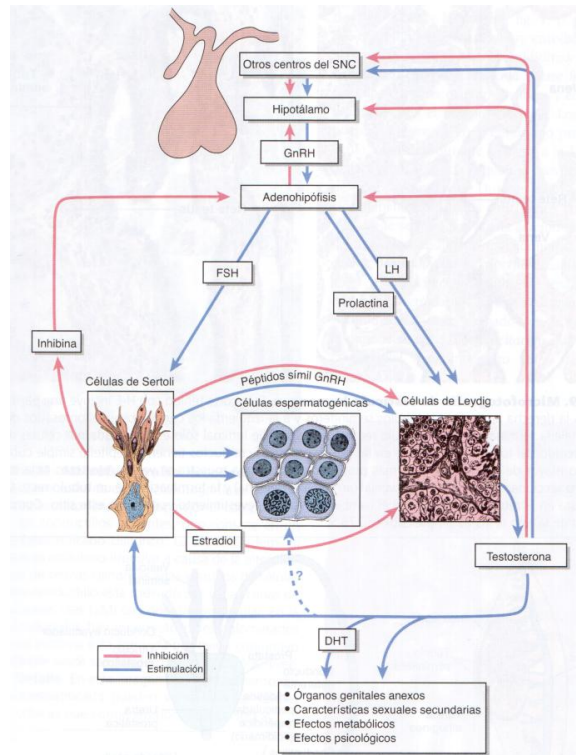


Figura 7. Vía de señalización Hipotálamo-Hipofisis-Testículo (Según Ross y Pawlina, 2009)

Ahora bien la secreción de LH se somete al control de los esteroides gonadales, tanto al nivel del hipotálamo como de la hipófisis, y esta acción es ejercida por testosterona y estradiol (hay que recordar que la testosterona puede convertirse en estradiol en la hipófisis y el cerebro, pero las dos hormonas parecen ser actuar independientemente en el sistema nervioso central).

La testosterona tiene un mecanismo de retroalimentación negativo sobre la secreción de LH en la hipófisis que no requiere aromatización, lo cual se ha demostrado con la DHT, que no se aromatiza a estrógenos e igualmente inhibe la secreción de LH.

El control retronegativo de la secreción de FSH está dado por las hormonas peptídicas y esteroideas provenientes del testículo. Los niveles de FSH aumentan proporcionalmente a la disminución del tejido germinal, mientras que los valores de LH se modifican poco, a menos que se tuvieran menores niveles de testosterona.

La célula de Sertoli secreta la inhibina, la cual es un péptido inhibidor específico de la secreción de FSH y es un heterodímero constituido por una subunidad α y una subunidad β con dos configuraciones denominadas inhibina A e inhibina B, esta última es la hormona fisiológicamente activa en su rol inhibidor de FSH.

La FSH estimula la producción de inhibina y además la FSH como la testosterona regulan su producción. Los dímeros de la subunidad β de la inhibina son conocidos como activina la cual estimula la liberación de la FSH; una proteína de origen hipofisiario conocida como folistatina se une a la activina y la inactiva.

La FSH actúa directamente sobre el túbulo seminífero, mientras que la LH incita la espermatogénesis, indirectamente, mediante la estimulación de testosterona por la célula de Leydig y, tanto FSH como testosterona, actúan en el testículo. Así, la FSH se une a sus receptores de membrana en la célula de Sertoli y las espermatogonias, y estimula la adenilciclase con aumento de AMP cíclico, con activación de proteinquinasas y fosforilación de proteínas (Palacios, 2009).

Espermiogénesis

Es el proceso a través del cual las espermátidas se transforman en espermatozoides maduros como se muestra en la fig. 8; puede tomar de 1-3 semanas, dependiendo de la especie. Requiere además de la síntesis de cientos de nuevas proteínas y el ensamblaje de organelos únicos. Dentro del ambiente de la célula de Sertoli, durante la diferenciación de espermátida a espermatozoide maduro, suceden varios eventos:

Formación del acrosoma

El acrosoma del espermatozoide maduro es formado a partir del aparato de Golgi, mientras que gránulos proacrosómicos, ricos en glicoproteínas y portadores de enzimas que digieren proteínas y carbohidratos complejos, son formados dentro de vesículas derivadas del cuerpo de Golgi en el futuro polo anterior del espermatozoide.

Directamente detrás de esta vesícula acrosómica aparecen los filamentos de actina encargados de posicionar el acrosoma sobre el núcleo y darle forma adecuada a estas estructuras. En la unión del acrosoma y el núcleo, la membrana de éste pierde su porosidad. El acrosoma es esencialmente una acumulación de lisosomas necesarios para la adecuada penetración de la zona pelúcida durante el proceso de fecundación. En la unión del acrosoma y el núcleo, la membrana de este pierde su porosidad. El acrosoma es esencialmente una acumulación de lisosomas necesarios para la adecuada penetración de la zona pelúcida durante el proceso de fecundación.

Desarrollo del flagelo

El flagelo del espermatozoide maduro, se desarrolla desde uno de los centriolos, que está localizado en el polo posterior de la espermátida, mientras que el otro centriolo se va a convertir en el cuello del espermatozoide. El flagelo es una estructura axonémica compuesta de un microtúbulo central doble unido y rodeado por nueve pares conectados de microtúbulos, los cuales van a convertir la energía de adenosintrifosfato (ATP) en movimiento. Una densa cubierta de células fibrosas se desarrolla alrededor del axonema, lo cual le da rigidez al flagelo y limita la movilidad espermática.

Reorganización de las mitocondrias alrededor de la pieza media

Mientras la cola se va formando en la espermátida en elongación, las mitocondrias, localizadas periféricamente, se van organizando en forma helicoidal alrededor de la base del flagelo para construir la pieza intermedia del espermatozoide. Entonces, las mitocondrias forman una cubierta continua que se envuelve alrededor de la pieza intermedia; constituyen una estructura piramidal que proporcionará energía para la movilidad espermática.

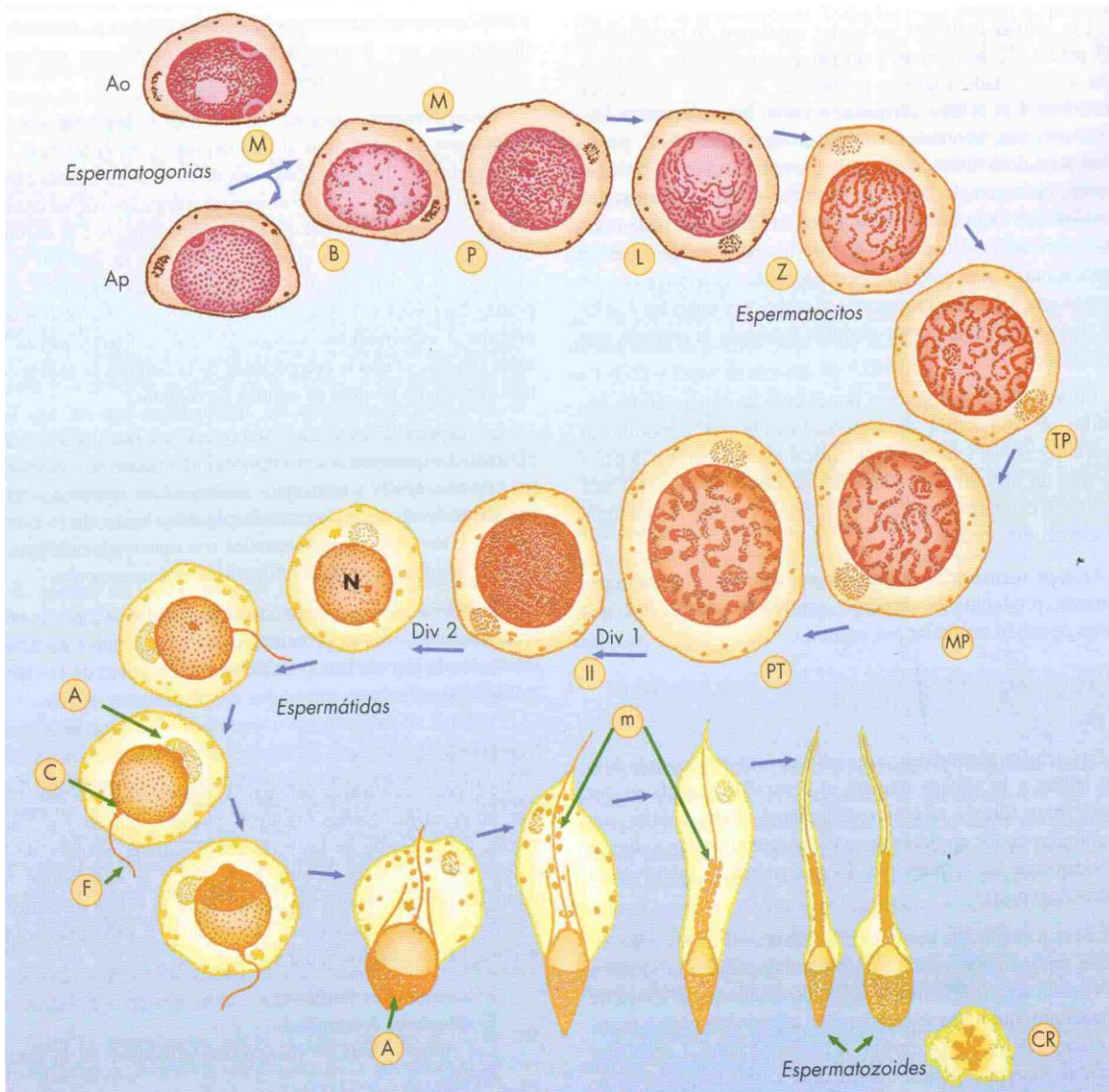


Figura 8. Modificación de una célula germinal para formar un espermatozoide humano. (Ao) espermatogonia oscura; (Ap) espermatogonia pálida; (B) espermatogonia tardía; (M) mitosis; (Div 1) primera división de maduración; (Div 2) segunda división de maduración (N) núcleo; (A) acrosoma; (C) centriolos; (F) flagelo; (m) mitocondria; (CR) cuerpo residual. (Heller y Clertmont, 1964)

Compactación del núcleo

Los cambios en el empaque del ADN (condensación) se suscitan simultáneamente; el núcleo de la espermatida redonda es esférico inicialmente, está localizado en el centro de la célula y contiene la cromatina descondensada

típica de la interfase. Subsecuentemente, el núcleo se desplaza hacia la membrana plasmática y cambia su forma a asimétrica.

Eliminación del cuerpo residual del citoplasma

A medida que la espermiogénesis continúa, la espermátida se va desplazando hacia la luz tubular y al completarse la elongación de la espermátida, el citoplasma de la célula de Sertoli se retrae alrededor del espermatozoide, retirándole el citoplasma que no es indispensable, este es desplazado hacia la luz tubular; finalmente se observa que el espermatozoide maduro tiene una mínima cantidad de citoplasma (Palacios, 2009).

Espermiación

El proceso de maduración termina con la espermiación o liberación de los espermatozoides en la luz del túbulo seminífero. Mediante los movimientos peristálticos, los espermias son transportados al epidídimo en cuya cola se almacenan. Durante la eyaculación junto con plasma seminal pasan por la uretra y a través de movimientos peristálticos se liberan en el tracto genital femenino.

El espermatozoide adquiere la capacidad de mover el flagelo en su tránsito por el epidídimo, pero el movimiento empieza después de la eyaculación. El movimiento del flagelo es característico y consiste en un bateo simétrico de la cola que hace que el espermatozoide se desplace en forma progresiva (Olivera y cols., 2006).

Estructura del espermatozoide

El espermatozoide humano maduro (ver fig. 9) es una célula alargada (de unas 60 micras de largo) y delgada que consiste en:

La cabeza: se encuentra el núcleo que contiene 23 cromátidas, es decir la mitad de la dotación cromosómica completa de una célula normal, con un citoplasma y una membrana citoplasmática muy delgada a su alrededor. Sobre el exterior de los 2/3 anteriores de la cabeza se encuentra un capuchón grueso, el acrosoma,

que contiene numerosos enzimas que ayudan al espermatozoide a penetrar en el ovocito secundario y así conseguir la fecundación.

La parte media: contienen una gran cantidad de mitocondrias en la parte proximal.

La cola: es la parte restante, que se muestra en la fig. 9, es un largo flagelo que contiene axonema y las proteínas motoras (dineína) en forma de microtúbulos con una estructura similar a la de los cilios, que sirven para que el espermatozoide pueda avanzar, lo que realiza por medio de un movimiento flagelar de la cola a una velocidad de 1-4 mm/min.

Activación espermática

La movilidad espermática se desencadena por cambios en el medio iónico extracelular, por interacción con ligandos específicos y por glucosa, presentes en el líquido seminal y en el tracto reproductivo femenino; estos cambios inducen señales citosólicas flagelares, a través de la fosforilación de proteínas, de canales de Ca^{++} y de vías dependientes de nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc) como se muestra en la fig. 10, (Olivera y cols., 2006).

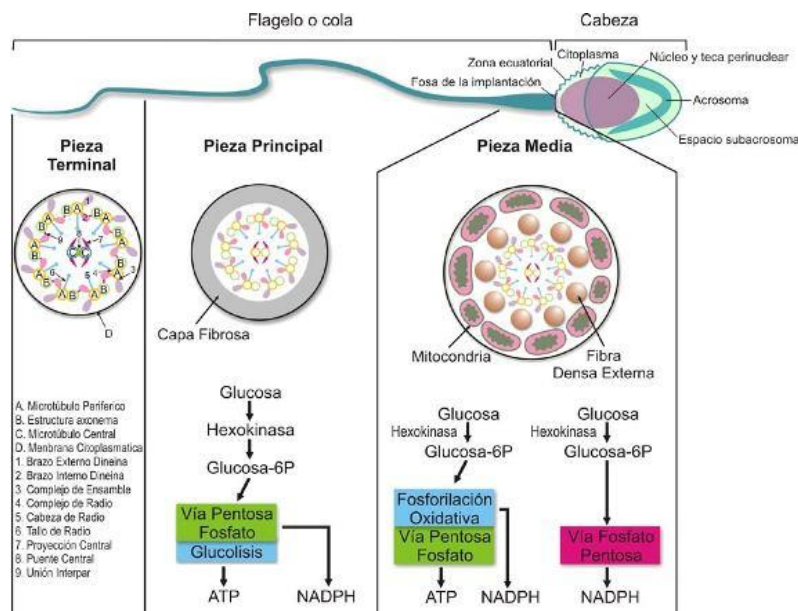


Figura 9. Morfología del flagelo del espermatozoide y metabolismo energético a partir de la glucosa en la pieza principal y en la pieza media. (Olivera y cols., 2006)

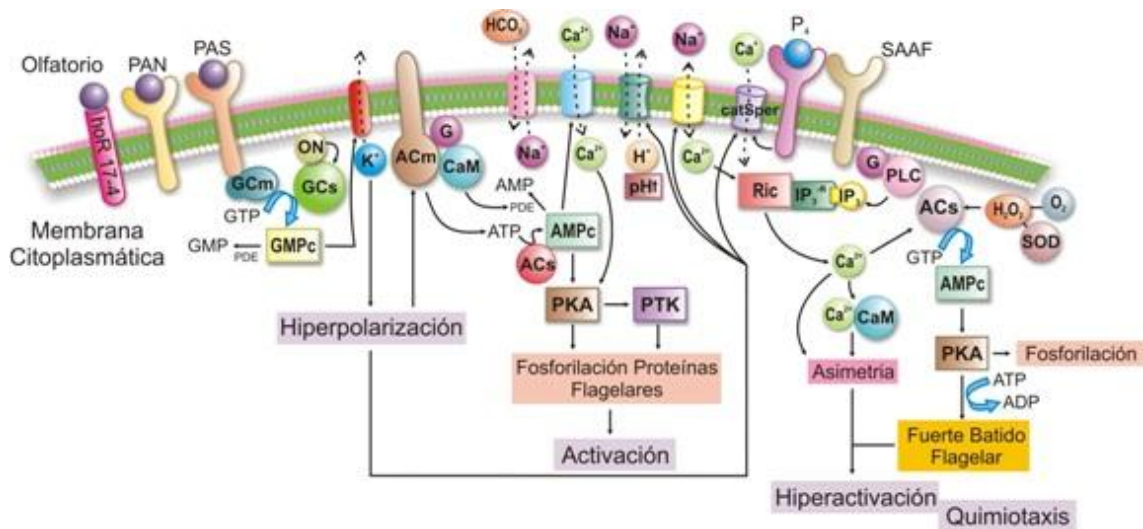


Figura 10. Modelo de los eventos moleculares que inducen la activación y la hiperactivación del flagelo. (Olivera y cols., 2006)

Los ligandos específicos más conocidos son: la progesterona y el esteroide sulfatado SAAF (Sperm Activating and Attracting Factor) que induce la entrada de Ca^{++} , el péptido activador de espermatozoide (PAS) y el péptido atrial natriuretico (PAN) que actúan, ya sea por medio de un receptor de membrana, o por activación directa de la guanilil ciclasa ligada a membrana (GCM).

Los cationes y los aniones también juegan un papel importante en la modulación de la movilidad espermática, el efecto mayor se atribuye a cationes tales como Ca^{++} , Na^+ , K^+ y H^+ . El tránsito de estos cationes inducido por diferencias de concentración extra e intracelular, lleva a cambios en la composición iónica intracelular y subsecuentemente cambios en el potencial funcional y de movilidad de espermatozoide. La activación se desencadena cuando las señales extracelulares activan las ciclasas, lo que produce un aumento transitorio de GMPc, de AMPc y la activación de la guanilil ciclasa transmembranal (GCM) o soluble (GCs). La GCM se activa por la unión del péptido PAS a su receptor, o por

el aumento en la concentración de GMPc; a la GCs la activa el óxido nítrico (N_2O_5) producido por la acción del óxido nítrico sintasa. Consecutivamente se abren los canales de K^+ dependientes de GMPc, lo que provoca la salida del K^+ con la consecuente hiperpolarización de la membrana espermática dependiente de AMPc.

El aumento de AMPc se debe a la activación de la adenil ciclasa de dominio transmembranal (ACm), y la activación de la fosfodiesterasa (PDE), reguladas, a su vez por la subunidad alfa de la proteína G y por Ca^{++}/CaM (calmodulina) respectivamente. La forma soluble de la adenil ciclasa (ACs) también produce AMPc, esta ACs es dependiente de bicarbonato (HCO_3^-) que ingresa por mediación del cotransportador Na/HCO_3^- . El Ca^{++} ingresa a través de canales cationicos específicos del esperma. El siguiente paso es la activación de la movilidad flagelar que es la fosforilación y desfosforilación de tirosinas mediadas por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (véase la fig. 7). La subunidad catalítica de la PKA, posee una estructura única y específica en el espermatozoide. La PKA está ubicada muy cerca al brazo de dineína externo y esto podría explicar la rápida fosforilación que sufren los polipéptidos (Olivera y cols., 2006).

El espermatozoide, activado y capturado por las microvellosidades del istmo del oviducto, se capacita, y esto desencadena señales intracelulares que inducen la hiperactivación. La activación y la hiperactivación utilizan mecanismos moleculares similares para generar el movimiento del flagelo cuyo eje funcional es el axonema (ver fig. 9) y cuya proteína motora principal es la dineína.

El axonema es una estructura de 9x2 pares de microtúbulos que corren a lo largo del flagelo rodeado (ver fig. 9), en la pieza media, por mitocondrias y capas de fibra densa; en la pieza principal, por una capa fibrosa y en la final está en contacto directo con la membrana plasmática. El movimiento del flagelo se da por la activación de los complejos de ensamble y de regulación de dineína; el ATP provee la fuerza que se requiere para el deslizamiento entre los brazos y los microtúbulos, y la hidrólisis del mismo, junto con la ruptura de la unión entre el

microtúbulo B. La dineína garantiza que el movimiento continúe como reacción en cadena de los nueve pares de microtúbulos externos generando el movimiento en forma de bateo (Olivera y cols., 2006).

Capacitación

Austin y Chang en 1951 descubrieron en forma independiente que los espermatozoides de los mamíferos deben residir en el aparato reproductor femenino durante algunas horas para adquirir su capacidad fecundante, este proceso fue llamado capacitación espermática, y se cree que comienza en el útero aunque el principal sitio de capacitación parece ser el oviducto, específicamente la región del istmo (Hunter and Nichol., 1983).

El espermatozoide en la cola del epidídimo, sufre cambios en los dominios de los esteroides de membrana, en la cabeza y en la cola. Estos dominios llamados complejos de esteroles-caveolina, sirven como andamio en la membrana para acoplar proteínas que inducirán diferentes rutas de señalización. En la cabeza hay dos subdominios de membrana plasmática, la acrosomal y subacrosomal. La primera cubre la región del mismo nombre y se caracteriza por presentar islas de composición ordenada de colesterol y esfingolípidos anclados a caveolinas inmersas en una membrana. La región subacrosomal, es rica en fosfolípidos. Las islas juegan un papel importante en la compartimentalización de las vías de señalización en regiones específicas de la célula.

La capacitación se caracteriza por la salida de colesterol de la membrana y el ingreso de Ca^{++} y HCO_3^- al citosol. El fluido oviductal es rico en albuminas y HDL, capaces de retirar el colesterol de la membrana del esperma, lo que la hace más fluida al producir la ruptura de la unión de las caveolinas con las proteínas de fusión; estas últimas al quedar libres forman complejos de señalización de fusión de membrana (reacción acrosomal); el aumento de la fluidez también permite que proteínas integrales puedan interactuar con las proteínas ancladas a membrana. La pérdida de colesterol favorece además la traslocación de algunas proteínas a la

zona ecuatorial, donde son necesarias para que el espermatozoide posteriormente pueda adherirse al oocito.

La salida del colesterol durante la capacitación también induce la activación de los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje y de los canales de HCO_3^- . El ingreso de éste último al citosol, activa a la adenilciclasa dependientes de HCO_3^- (ACs) que aumenta las concentraciones de AMP cíclico, activando, a su vez, la proteína quinasa A1 (PKA1); esta última fosforila algunas proteínas en los residuos de serina desencadenando la fosforilación de las tirosinas y de otras proteínas citosólicas. La PKA1 también activaría en la membrana acrosomal externa un canal de Ca^{++} , con el consecuente aumento de las concentraciones citosólicas de este catión, las cuales gradualmente activan las fosfolipasa C γ acoplada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (Olivera y cols., 2006).

Estos aspectos fisiológicos han sido considerados en el diseño de estrategias aplicadas en las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) para mejorar la tasa de fecundación en humanos.

Los métodos de selección espermática contemplan: el aislamiento de los espermatozoides de otras células como de los leucocitos y del plasma seminal, esto para evitar el contacto con sustancias tóxicas que impidan la capacitación espermática como bacterias o anticuerpos antiespermáticos que pudiera tener el plasma seminal; la recuperación que emplea diversos materiales para obtener mayor cantidad de gametos más viables en términos de su morfología y movilidad (recuperación de espermatozoides móviles); la incubación con medios de constitución similar a la del tracto femenino para promover la capacitación.

Los métodos conocidos para la selección espermática son clasificados de acuerdo con los principios físicos, como son:

Filtración que se basa en el paso de espermatozoides móviles por materiales como la fibra o perlas de vidrio o bien por columnas de cromatografía y su separación de gametos no viables, leucocitos, etc.

Centrifugación por gradientes de densidad, este método emplea sustancias coloidales que permiten una preparación isopícnica de espermatozoides

Citometría de flujo: es un método que separa a espermatozoides en suspensión empleando sondas marcadas con sustancias fluorescentes dirigidas hacia componentes físicos o químicos de las células.

Migración: dentro de los cuales se encuentran migración ascendente (*swim up*), migración descendente (*swim down*) o la migración – sedimentación, los cuales se basan en la capacidad de los espermatozoides de trasladarse hacia el medio de cultivo y posteriormente poder ser separados. Para el método de *swim up*, este procedimiento es utilizado frecuentemente en las TRA de baja complejidad como la inseminación artificial, en muestras con oligoastenozoospermia leve (número de espermatozoides totales por debajo del límite de referencia inferior de acuerdo al manual de la 5ta edición de la OMS).

Antecedentes

Las dificultades para tratar al hombre con disminución de fertilidad inician desde la delimitación de los parámetros de normalidad. Antes solo se trataba a los hombres con oligozoospermia grave y se dejaba sin tratamiento a los casos leves y moderados con mejor pronóstico. Otro conflicto de lo más común consiste en encontrar anomalías múltiples en la función espermática sin etiopatogenia específica, que impide efectuar tratamiento etiológico (Pérez, 2011).

El espermograma es el estudio fundamental del hombre que consulta por infertilidad. El análisis del semen provee información esencial a partir de la cual se orientan los estudios subsiguientes. Las diferentes variables del semen han sido revisadas a lo largo de las últimas 7 décadas, a partir de los estudios realizados por MacLeod (1970).

Desde los primeros intentos de conservación de semen, llevados a cabo por Spallanzani en 1776 hasta el día de hoy, se han logrado técnicas que permitan almacenar semen por largos periodos de tiempo. La criopreservación de semen es un procedimiento importante en el tratamiento de la infertilidad humana. Es una parte complementaria del tratamiento terapéutico en hombres jóvenes con enfermedades malignas tales como cáncer testicular o enfermedad Hodking. Puede además hacerse extensivo para aquellos varones que van a realizar vasectomía y desean conservar una muestra de su semen para posibles tratamientos futuros de reproducción, ó bien para el varón en una pareja con tratamientos de reproducción asistida.

No fue hasta 1947 (83 años después) en que Polge, Smith y Parkes descubrieron los efectos crioprotectores del glicerol sobre los espermatozoides y otras células de varias especies (Polge y cols., 1949).

Rall y Fahy describen, en 1985, el método de vitrificación como un potencial alternativo a los protocolos de descenso lento de la temperatura, la vitrificación involucra la exposición de las células a altas concentraciones del medio

crioprotector por breves periodos a temperaturas ambientes, seguido de la inmersión directa al nitrógeno líquido (Rall y Fahy, 1985).

La fertilidad del semen criopreservado es inferior a la del semen fresco. Este hecho está relacionado con los daños subletales insaturados en la población espermática que sobrevive al proceso de congelación. Diversos factores (shock de frío, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico) que ocurren durante el proceso de la congelación, son responsables de la disminución de la fertilidad en el semen congelado (Stornelli y cols., 2005).

Criopreservar una célula cualquiera consiste en exponerla primero a una solución salina hipertónica simple que contiene una sustancia “crioprotectora” permeable (como el mencionado glicerol) y/o a una no permeable (como la sacarosa y yema de huevo), esto va ser que la célula se deshidrate y que el agua intercelular sea reemplazada por las sustancias crioprotectoras permeables, llenándose así de glicerol (en su caso) en lugar de agua.

Se sabe que el proceso de congelación/descongelación está asociado con un descenso de la motilidad y viabilidad espermática, pero está demostrado que un porcentaje de espermatozoides congelados mantienen su capacidad fecundante, sin embargo la motilidad es un factor importante para la fecundación (Yogev y cols., 1999; Chatterjee y cols., 2001; Blanes y cols., 2004).

Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación, y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (Watson, 1995). Crister y cols., en 1980, observaron que los espermatozoides descongelados motiles, con membranas intactas, no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco. Estas observaciones se relacionan con cambios semejantes al proceso de la capacitación, inducida por el método de congelación en las células espermáticas.

El almacenamiento de semen congelado en otras especies se realizó con el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol (Polge y cols.,

1947), esto permitió el desarrollo de las técnicas de congelación espermática en las especies domesticas. Desde entonces se han desarrollado varias técnicas de congelación de semen.

En el proceso de congelación de los espermatozoides, éstos son sometidos a una disminución gradual de la temperatura, lo que produce una reducción reversible de su actividad metabólica. En la especie ovina este estado alcanza temperaturas cercanas a los -75°C (Maxwell y cols., 1995). Una congelación adecuada debe permitir a los espermatozoides mantener en el tiempo su integridad y capacidad funcional (Watson y Martin, 1972).

Los espermatozoides que han sobrevivido a la congelación a -196°C , se enfrentan a la fase de calentamiento y descongelación, y para esto deben atravesar nuevamente las dos temperaturas críticas. La descongelación, al igual que el enfriamiento, ejerce un efecto negativo en la sobrevivencia del espermatozoide (Salamon, 1995a).

La vitrificación, descrita inicialmente en embriones por Rall y Fahy (1985), corresponde a una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene los agentes crioprotectores y ovocitos o embriones con el nitrógeno líquido ($\text{N}_2 \text{ L}$). La definición física de la vitrificación es la solidificación de una solución a baja temperatura sin que esta llegue a cristalizar debido a un enorme incremento en la viscosidad (Fahy, 1986), manteniendo así la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación (Fahy y cols., 1984).

La estrategia de la vitrificación es básicamente diferente a la congelación lenta. Una velocidad lenta de congelación intenta mantener un delicado balance entre varios factores los cuales pueden resultar en lesiones celulares provocadas por la formación de cristales de hielo, los choques osmóticos, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentración de electrolitos intracelulares, los daños por enfriamiento, las fracturas en la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos intracelulares, el citoesqueleto o el contacto entre las células (Massip y cols., 1995;

Dobrinsky, 1996; Kasai, 1996; Martino y cols., 1996; Saha y cols., 1996). La vitrificación elimina totalmente la formación de cristales de hielo ya que al aumentar la velocidad de congelación disminuyen los daños causados por el enfriamiento pasando rápidamente por la zona de mayor peligro que está situada entre los 15°C y los -5°C (Dobrinsky, 1996; Marino y cols., 1996; Isachenko y cols., 1998).

A una velocidad de descongelación rápida, el espermatozoide se expone por un tiempo más corto a un soluto concentrado y al crioprotector, esto hace que la restauración del equilibrio intra-extracelular sea más rápida que en la descongelación lenta (Salamon y Maxwell, 2000).

Para el semen de carnero congelado, en pajuelas, la temperatura de descongelación más frecuentemente utilizada, ha sido de 38-42 °C. Algunos reportes indican que los resultados que arrojan la descongelación a altas temperaturas de 60-75°C, son comparables con los obtenidos a temperaturas menores de 38-42°C, sin que esto produzca diferencias considerables en la motilidad post descongelación, integridad de acrosoma y fertilidad (Salomon y Maxwell, 2000).

Temperaturas entre 37 y 75°C han sido examinadas y generalmente las mejores tasas de motilidad post-descongelación son observadas a las temperaturas más altas.

Después de la descongelación, el espermatozoide puede conservar su motilidad, aun siendo dañado, en este caso es dudoso si tal célula será capaz de fecundar un ovocito. La motilidad y la estructura del espermatozoide se afectan en diferentes intensidades y no se sabe si los cambios ocurren simultáneamente o son causados en diferentes etapas del proceso de congelación. Aunque una proporción relativamente alta de los espermatozoides (40-60%), preserva su motilidad luego de la congelación-descongelación, solo un 20-40% permanece biológicamente intacto (Salomon y Maxwell, 2000).

Se ha demostrado que los agente crioprotectores tienen una capacidad crioprotectora, que favorecen la supervivencia de los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación. De estos el glicerol y la yema de huevo, son los agentes más comúnmente utilizados en la congelación de semen ovino. Las mejores tasa de supervivencia espermática de la especie ovina, se han logrado con concentraciones de glicerol entre 4 y 6% (Fraser, 1968). Concentraciones mayores a estas disminuirían la sobrevivencia de los espermatozoides post-descongelación (Graham y cols., 1978).

Criopreservar gametos nos permite almacenar material genético en un rango de usos muy variados, desde las necesidades de preservación de la fertilidad de los pacientes con cáncer, hasta la reproducción de las especies de interés agropecuario o la preservación de genomas en las especies animales y vegetales amenazadas. En fertilidad asistida humana permite manejar el tiempo de ocurrencia de los eventos de la fecundación (Bisioli, 2006).

Justificación

El estilo de vida que actualmente lleva la población humana, se ha modificado mediante la alimentación, consumos de sustancias nocivas para la salud, factores ambientales, estrés laboral, enfermedades que pueden o no ser crónicas, etc. Estos factores nos han llevado a problemas en la reproducción como lo es la infertilidad masculina, cada día nos encontramos con diferentes problemas de esta índole y actualmente un 15% de la población juvenil en edad reproductiva se ven afectada, ya que después de un año de la búsqueda de un embarazo, no logran conseguirlo.

Para el caso de las enfermedades que actualmente están afectando a la población masculina en adolescentes, como lo son la diabetes, el cáncer, hipertiroidismo y otras más, los pacientes tienen que ser sometidos a tratamientos muy drásticos en los que se ven afectados incluso a nivel celular, como son los tratamientos quimioterapéuticos ó radioterapéuticos, los cuales van afectar a las células germinales, por tanto es recomendable que antes de que los pacientes fueran expuestos a este tipo de tratamientos, se realizara una preservación de células gaméticas para su uso en futuras fertilizaciones en dado caso que el paciente dese tener un hijo.

Sin embargo para llevar a cabo este tipo de preservación celular, es importante conocer el tipo y la estructura de la célula como tal, del requerimiento o no de medios que van a favorecer a la preservación y de técnicas que nos ayuden a conservar células sin dañarlas para sus usos posteriores.

La conservación de espermatozoides requiere de una reducción del metabolismo celular con el fin de prolongar su vida útil. Esto se logra mediante la disminución de la temperatura espermática y el uso de sustancias protectoras que minimizan el daño celular.

A pesar de las considerables mejoras alcanzadas con la modificación de los medios de congelación y las técnicas de congelación-descongelación, el proceso está asociado a una pérdida de motilidad espermática del 25-75 %. La

congelación/descongelación de espermatozoides induce un incremento en la generación de radicales superóxido que puede provocar la peroxidación de los lípidos de las membranas espermáticas, alterando su fluidez y afectando a su función. Algunos espermatozoides criopreservados contienen membranas intactas tras la descongelación pero están inmóviles debido a un bajo estado metabólico (Sharma y cols., 1996). Estos factores pueden justificar que tras la descongelación de espermatozoides, solo aproximadamente un 50% de las muestras mantienen una motilidad apropiada para poder ser utilizadas en una inseminación artificial (Suvro and Claude, 2001).

El estudio de la criopreservación por vitrificación y el uso de diferentes temperaturas para desvitrificación en espermatozoides humanos previamente capacitados nos proporcionarán mejores alternativas para obtener óptimos resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al evitar los daños que se producen principalmente en la membrana celular durante estos procesos.

El empleo de estas técnicas de vitrificación rápida para la criopreservación de los espermatozoides, podrá ser utilizado como herramienta en las Técnicas de Reproducción Asistida de baja y alta complejidad.

Hipótesis

Las muestras de semen recuperan su movilidad y viabilidad celular después de haber sido capacitadas, vitrificadas y desvitrificadas a temperaturas mayores de 37°C.

Objetivo General

Criopreservar espermatozoides humanos capacitados por la técnica de vitrificación rápida y determinar la temperatura óptima de desvitrificación para recuperar movilidad y viabilidad celular.

Objetivos particulares

1. Estudiar el efecto de la vitrificación de muestras de espermatozoides humanos capacitados y s/capacitar, con un criopreservador a base de yema de huevo, etilenglicol y glucosa.
2. Evaluar la movilidad y vitalidad en los espermatozoides capacitados y s/capacitar antes de vitrificar.
3. Analizar el efecto de la temperatura de desvitrificación (37, 40 y 60°C) sobre la movilidad y vitalidad en espermatozoides humanos.

Materiales y Métodos

Este estudio de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la Reproducción, en la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Muestras Seminales

Las muestras seminales se obtuvieron a partir de donadores de entre los 18-34 años de edad, por el método de masturbación en frascos esterilizados.

Para la obtención de las muestras de semen, a los donadores se les dio las siguientes instrucciones:

- 1) Abstinencia sexual de 2 días como mínimo
- 2) Efectuar lavado genital con agua y jabón
- 3) Colectar la muestra por método de masturbación
- 4) Depositar la muestra completa de semen en un recipiente de polipropileno estéril

Las muestras que fueron colectadas en el hogar del donador, fueron entregadas posteriormente a la obtención de la misma, al laboratorio dentro de los 60 minutos, conservando la muestra a una temperatura corporal.

A cada donador se le otorgó un cuestionario para obtener datos importantes que pudieran ser de apoyo en alguna anomalía durante el seminograma posteriormente realizado. (Anexo 1)

Análisis espermático

Las muestras seminales obtenidas de los donadores, se sometieron a un "Seminograma o espermato-bioscopia", y el diagnóstico se basó en los parámetros que considera normales el manual de la OMS 5ta. edición (ver Tabla 1). Se

seleccionaron 40 muestras con una espermatobioscopia normal, de las cuales se tomaron 20 para el grupo experimental y 20 para un grupo control, posteriormente estas muestras fueron procesadas por vitrificación en vapores de N₂ (L).

Tabla 1. Valores de referencia del manual 5ta edición de la OMS (espermatobioscopia).

Análisis macroscópico	
	Valores de referencia
Licuefacción	Completa (dentro de los 60min.)
Viscosidad	Normal
Volumen (ml)	≥ 1.5
pH	7.2-8
Análisis microscópico	
Movilidad A+B	≥40%
Concentración (por ml)	≥15x10 ⁶
Concentración (eyaculado)	≥39x10 ⁶
Vitalidad	≥58%
Morfología	≥4%

Espermatobioscopia

En cada muestra se realizó un análisis macroscópico del semen, que comprendió:

El grado de licuefacción: La muestra se licuo completamente a 37°C dentro de los primeros 60 minutos después de la eyaculación.

Aspecto: Una muestra normal es de color gris o blanco opalescente o ligeramente amarillenta. Por las patologías puede presentar un aspecto diferente, puede presentar un color transparente cuando la concentración de espermatozoides es baja y marrón cuando contiene glóbulos rojos.

Volumen: El semen fue transferido a tubos cónicos de 15 ml. Las jeringas plásticas y agujas de inyección no deberán ser utilizadas, ya que alteran la movilidad (ver fig. 12a).

Viscosidad: La muestra fue aspirada con una pipeta de transferencia permitiendo la libre caída de gotas, en la que se observó la longitud del filamento y se clasificará como:

- a) Normal: Gotas pequeñas, bien definidas, goteando libremente con cierta consistencia (ver fig. 12 b)
- b) Disminuida: goteo libremente con consistencia de agua.
- c) Aumentada: no forma gotas, presenta filancia (filamento mayor de 2 cm).

El pH: Se determinó impregnando una gota de semen, previamente homogenizada en la tira reactiva de pH, posteriormente se comparó el color obtenido de la tira con la escala del contenedor del papel indicador. El pH de una muestra normal deberá caer en el rango de 7.2-8.0 (ver fig. 11 c).

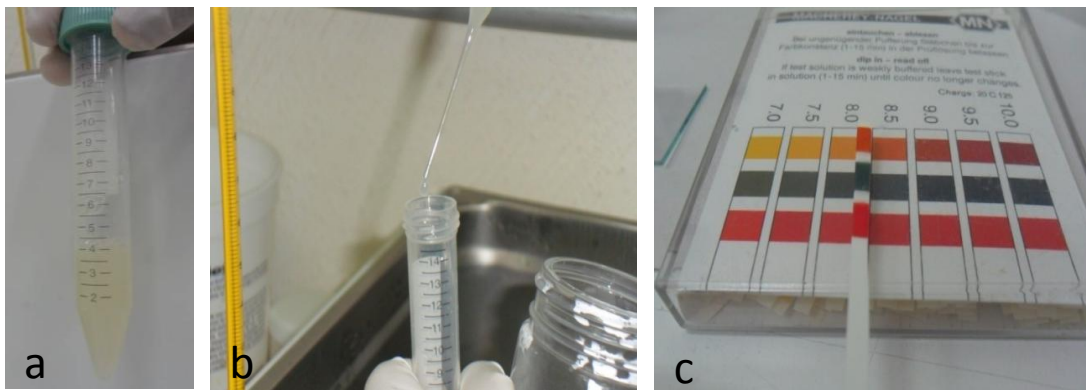


Figura 11. Análisis macroscópico de la muestra: b) Viscosidad, a) Volumen y Apariencia, c) Determinación del pH.

Análisis microscópico de la muestra.

El examen microscópico del semen comprendió de la valoración de:

- a) La movilidad espermática

Preparación de la alícuota: el semen se homogenizó con pipeteos continuos suaves, posteriormente, se tomó una alícuota de 10 μ l y se colocó en un portaobjetos de 25x75 mm, y utilizó un cubreobjetos de 22x22 mm, esto permitió tener un espesor de aproximadamente 0.20 μ m dando lugar a la expresión completa del movimiento rotatorio de los espermatozoides en donde fue evaluada la movilidad A (progresiva), B (in situ) y C (no progresiva).

- b) Análisis de la viabilidad espermática

La viabilidad se realizó mediante la técnica de tinción con eosina nigrosina, se preparó una alícuota con 5 µl de la muestra seminal, se colocó en un portaobjetos (de 25x75 mm), previamente homogenizado, se le aplicó 5µl de eosina nigrosina y se utilizó un cubreobjetos (de 22x22 mm) para observar por microscopía óptica la cantidad de espermatozoides vivos.

c) Análisis de concentración espermática

Es importante que la muestra este perfectamente homogenizada para que la obtención de la alícuota sea representativa. Se tomaron 10 µl de la muestra, se colocaron sobre un portaobjetos y protegió con un cubre objetos. La preparación se observó por microscopía óptica y se procedió a contar todos los espermatozoides que se encontraran en 3 campos a 40x (conteo grueso).

Tabla 2. Diluciones de semen recomendadas para el conteo de células en el Hemocitometro.

N. de espermatozoides contados x campo en el objetivo de 40x	Dilución (semen + diluyente)	Semen (µl)	Diluyente (µl)
< 15	1:5 (1+4)	100	400
15-40	1:10 (1+9)	50	450
40-200	1:20 (1+19)	50	950
>200	1:50 (1+49)	50	2450

Posteriormente se realizó una dilución como se indica en la Tabla 2. Para inmovilizar a los espermatozoides, se empleó un diluyente a base de formaldehído, se homogenizó perfectamente y se tomaron 10 µl de la dilución para colocarlas en cada una de las cámaras del Hemocitometro (fig. 12), posteriormente se procedió al conteo de las células espermáticas. Se inició en el primer cuadro superior izquierdo de la cuadrícula central, como se muestra en la fig. 12 y en base al número encontrado se realizó el conteo espermático correspondiente de acuerdo a la Tabla 3.

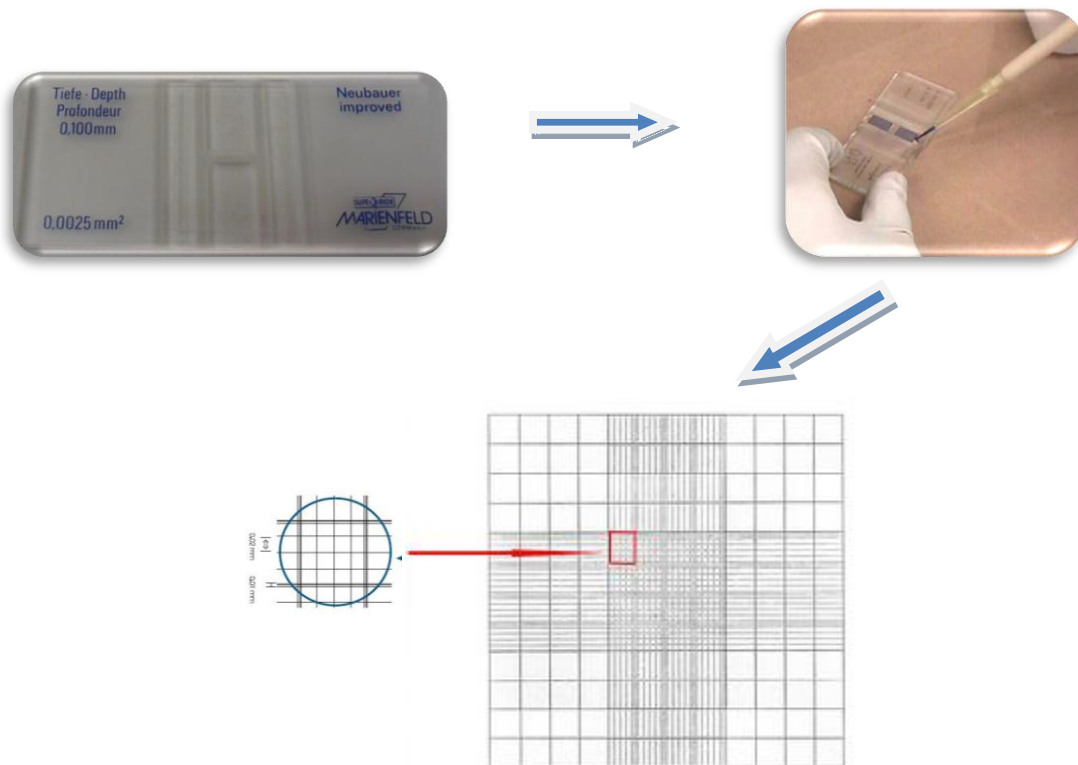


Figura 12. Fotografías del hemocitometro, su llenado con la muestra de semen diluida y representación de la cuadrícula (cámara de Neubauer).

Tabla 3. Número de espermatozoides contados en el cuadro superior izquierdo de la cuadrícula central y el número de cuadros a contar para la determinación de la concentración de células por mL.

No. de espermatozoides contados en el cuadro superior izquierdo	No. de cuadros contados de la cuadrícula central del Hemocitómetro
<10	25
10-40	10
>40	5

d) Evaluación morfológica espermática

Se realizó un frotis con la muestra, se secó y fijó con alcohol al 70%, posteriormente se tiñeron con Eosina Nigrosina y al final se enjuago con agua destilada para posteriormente ser evaluar por microscopia óptica la morfología celular en un objetivo de inmersión (100x). Se contaron en diferentes campos, los

defectos de cabeza (DC), defectos de pieza media (DM), defectos de flagelo (DF) y espermatozoides normales (N) (figs. 13 a, b y c).

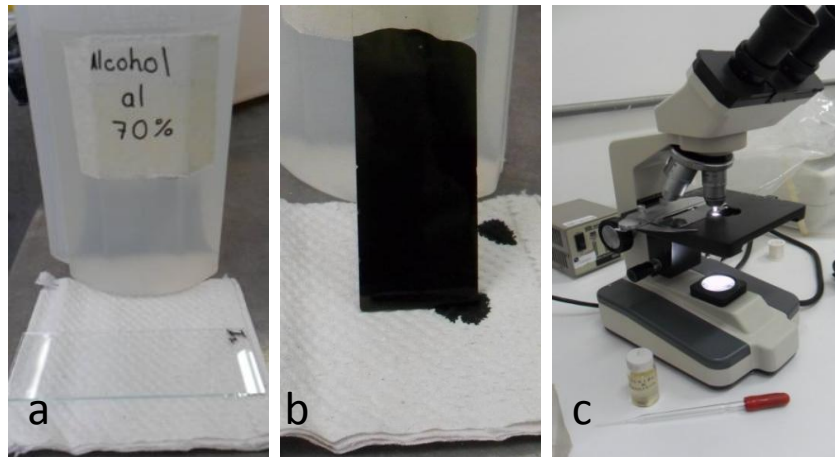


Figura 13. Técnica de tinción celular: a) fijación de las células en un frotis, b) Tinción de las células con el colorante Eosina Nigrosina y c) observación de la morfología por microscopía óptica de inmersión.

Grupo control: Muestras de semen normospérmicas.

Las muestras del grupo control, una vez realizado la espermatobioscopia, se adiciono a cada muestra un crioprotector a base de yema de huevo en una concentración 1:1 para ser vitrificadas.

Grupo experimental: Capacitación y selección de los espermatozoides por la técnica de Swim up.

La capacitación se realizó posterior a la espermatobioscopia y previamente a la preparación para la vitrificación.

Una vez determinada que la muestra era normospérmica se capacitó y seleccionaron los espermatozoides por la técnica de Swim up, para esto se realizaron los siguientes pasos:

La muestra se lavó y capacitó con los medios Fluido Tubarico Humano (HTF, Invitro Care Maryland, USA) y HTF amortiguado con hidroxietanepropoxietane (HTF-Hepes), ambos medios fueron suplementados con suero HSA al 10%.

a) Lavado de la muestra

Se tomaron 0.5 ml de la muestra que se resuspendió en 0.5 ml de HTF-Hepes + HSA. Posteriormente se centrifugo a 1500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante de manera que la pastilla (paquete celular) obtenida quedara intacta.

b) Incubación

El tubo que contenía este paquete, se agito ligeramente con el propósito de aflojar las células espermáticas. Con una ligera inclinación y por las paredes del tubo, se deslizo HTF s/Hepes + HSA al 10% y posteriormente se incubó en baño maría a 37°C durante 45 minutos.

Al término de este tiempo, se recuperó el sobrenadante para ser transferido a nuevo tubo eppendorf. Se evaluó movilidad y viabilidad celular por microscopia óptica a 40x.

Proceso de vitrificación rápida

Para la técnica de vitrificación rápida con vapores de N₂ (L) a la muestra se agregó un crioprotector elaborado a base de yema de huevo (véase tabla 4).

Tabla 4. Crioprotector a base de yema de huevo. (Fórmula para 50ml)

Yema de huevo	12%	4.8 ml
Glucosa	5.5%	2.2 grs
Etilenglicol	3.5%	1.4 ml
Estreptomicina		4 mg

Las muestras de ambos grupos, tanto control (no capacitadas) como experimental (capacitadas), se prepararon para la vitrificación al realizar una mezcla 1:1 de la muestra más el crioprotector (0.5 ml de muestra + 0.5 ml de crioprotector) se homogenizo perfectamente y se dejó a temperatura ambiente para dejar actuar el crioprotector sobre las células espermáticas.

Se vertió N_2 (L) en un recipiente de polipropileno con tapa que contenía una gradilla metálica la cual quedaba sumergida en el N_2 , se colocó un porta objetos sobre la gradilla y sobre este la muestra para su vitrificación. Para almacenar las muestras se utilizaron viales criogénicos estériles (Corning Incorporated), de Polipropileno previamente rotulados y estabilizados en vapores de N_2 (ver fig. 14 a y b).

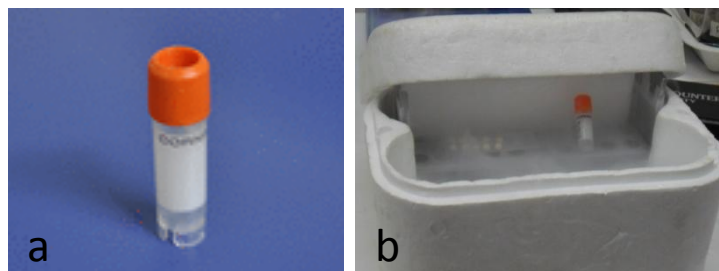


Figura 14. a) Vial criogénico de 2.0 ml (Corning Incorporated). B) Vial criogénico atemperado en vapores de N_2 (L) para almacenar la muestra.

La muestra se preparó en perlas al utilizar una micro pipeta graduada de 10-100 μ l, se vertieron alícuotas de 80 μ l de la muestra sobre el portaobjetos para la formación de estas perlas en los vapores del N_2 (L). Los portaobjetos se dejaron sobre los vapores hasta que las perlas se tornaban opacas. Posteriormente se colocaron en los viales criogénicos y se dejaron por 15 minutos más para después ser sumergidos y almacenados en el tanque de N_2 (L) (fig. 15).



Figura 15. Vitrificación de la muestra en forma de perlas sobre un portaobjetos en vapores de N_2 (L).

Una perla fue desvitrificada al día siguiente, para asegurar que la técnica de criopreservación fue realizada correctamente al determinar que la movilidad y viabilidad fue preservada en los espermatozoides.

Desvitrificación

Después de ser almacenadas las muestras durante tres meses, se desvitrificaron y evaluó movilidad y vitalidad celular a diferentes temperaturas: 37, 40 y 60°C (grupo control y experimental).

La desvitrificación a las diferentes temperaturas se realizó a baño maría.

Para la desvitrificación a 37°C (fig. 16a) se tomó una perla de un vial criogénico, se colocó en un tubo eppendorf al cual se le agregaron 80 μ l de solución HTF (Human Tubal Fluid, ver anexo 2). Inmediatamente después el tubo se pasó a 37°C para su descongelación la cual tomo 20 seg, después de 3 min la muestra alcanzó la temperatura de 37°C. Se determinó la movilidad y viabilidad celular por microscopía óptica a 40x después de 5 min adicionales de incubación a 37°C (fig.

17). Para la movilidad se realizó una preparación con 10 μl de la muestra homogenizada. Se evaluó movilidad A (progresiva) B (in situ) y C (no progresiva). Para la viabilidad celular, se tomaron 5 μl de la suspensión celular y 5 μl de eosina nigrosina en un portaobjetos, se homogenizo, se le colocó un cubreobjetos y se procedió al conteo de células viables (fig. 18).

Para la desvitrificación a 40°C (fig. 16b) se tomó una perla de las células vitrificadas y se colocó en un tubo eppendorf al cual se le agrego solución HTF (80 μl) e inmediatamente se incubó el tubo a esta temperatura por 16 seg. Posteriormente el tubo se incubó en baño maría a 37°C (fig. 17) por 5 min y se procedió a evaluar la movilidad y viabilidad, como anteriormente se describe.

Para la desvitrificación a 60°C (fig. 16c) se tomó una perla de espermatozoides vitrificados, se colocó en un tubo eppendorf al cual se le agrego solución HTF (80 μl), se incubó a esta temperatura por 10 seg y posteriormente la muestra se incubó en baño maría a 37°C (fig. 17) por 5 min para posteriormente evaluar la movilidad y viabilidad.

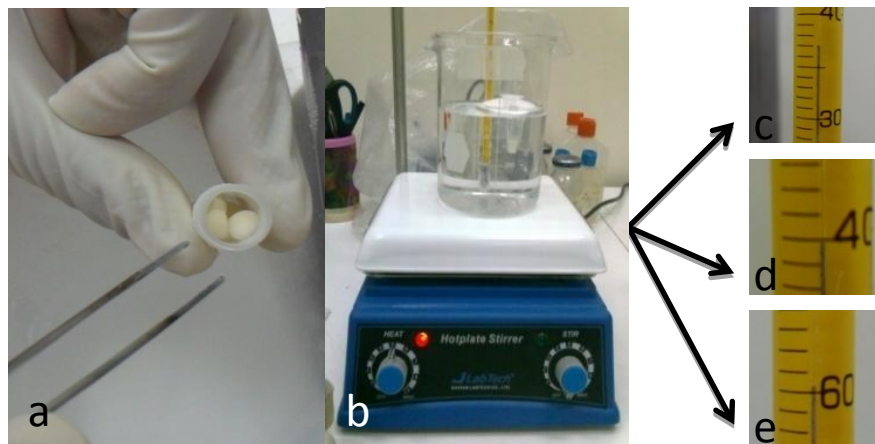


Figura 16. Desvitrificación de las muestras a baño maría: a) Perlas de espermatozoides vitrificadas, b) baño maría, c) 37°C x 20s, d) 40°C x 16s y e) 60° C x10s.

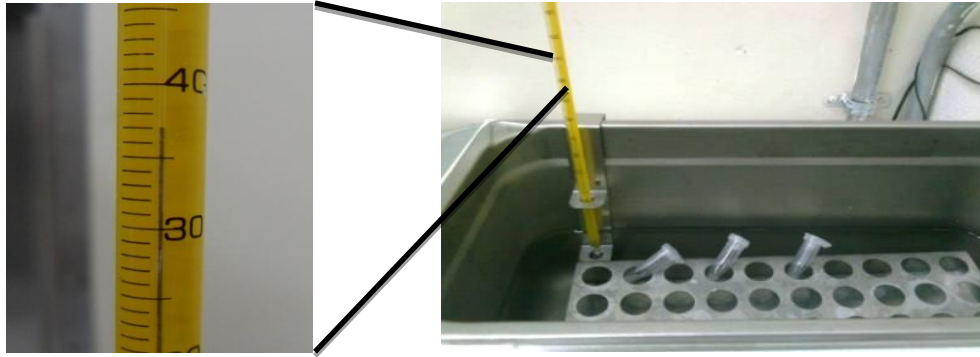


Figura 17. Muestras en baño maría a 37°C.

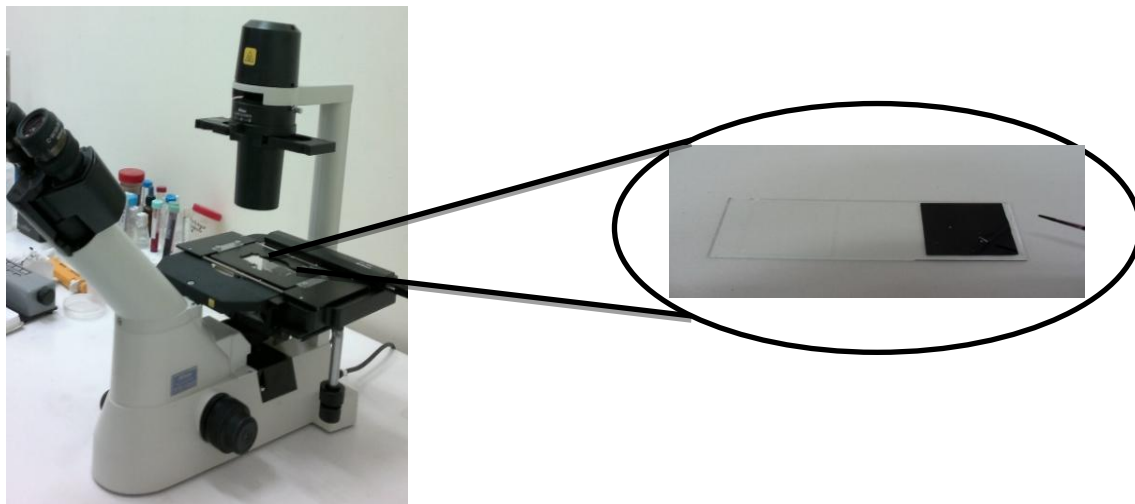


Figura 18. Evaluación de la Movilidad espermática A, B y C, y evaluación de la viabilidad celular en un microscopio óptico invertido.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados en Excel y Sigmaplot en donde se utilizó una t Student para analizar las diferencias de la movilidad total y la viabilidad celular del grupo control contra el grupo experimental.

Resultados

Para este estudio se utilizaron las muestras de semen que presentaron valores normales en el análisis de la espermato-bioscopia, de acuerdo al manual de la 5ª edición del la OMS como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Valores de referencia de acuerdo a la 5ta edición del Manual del análisis y proceso del semen humano de la OMS y valores obtenidos en las espermato-bioscopias realizadas.

Análisis macroscópico		
	Valores de referencia	Valores promedio de las muestras
Licuefacción	Completa (60 min.)	
Viscosidad	Normal	
Volumen (ml)	≥ 1.5	3.2
pH	7.2 - 8	8.2
Análisis microscópico		
Movilidad A + B:	≥ 40%	77.43%
Concentración (x ml)	≥ 15 x 10 ⁶	88.67 x 10 ⁶
Concentración (Eyac.)	≥ 39 x10 ⁶	287.42 x 10 ⁶
Vitalidad	≥ 58 %	74.8%
Morfología (Normal)	≥ 4%	36%

Las imágenes que se muestran a continuación son fotografías que muestran la preparación de los análisis microscópicos durante la espermatobioscopia: presencia de otras células, aglutinaciones, agregaciones, viabilidad celular y defectos en la morfología.

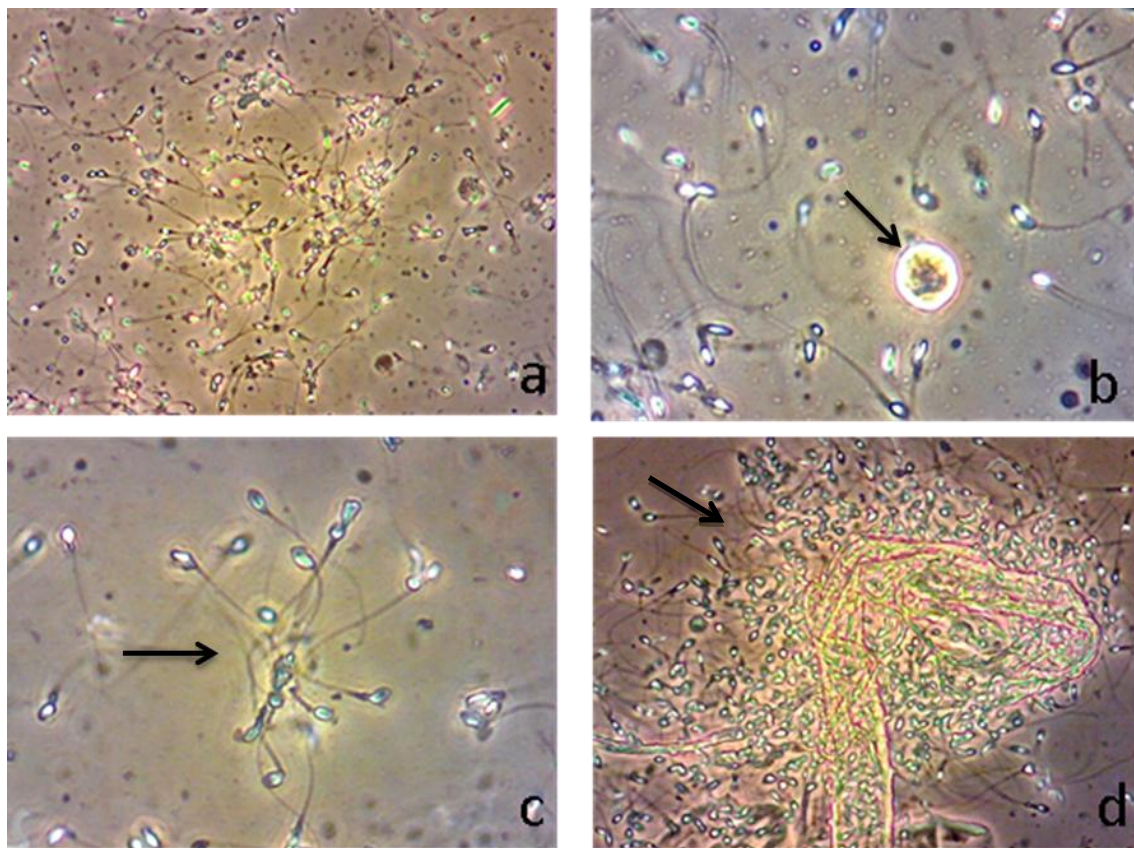


Figura 19. Imágenes de espermatozoides por microscopia óptica. a) Espermatozoides 20x; b) Presencia de leucocitos 40x; c) Aglutinaciones 40x y d) Agregación 20x.

En la fig. 19 se muestra fotografías de espermatozoides en donde se observa: a) una preparación para el análisis microscópico, b) presencia de leucocitos, c) aglutinaciones y d) agregaciones (flechas).

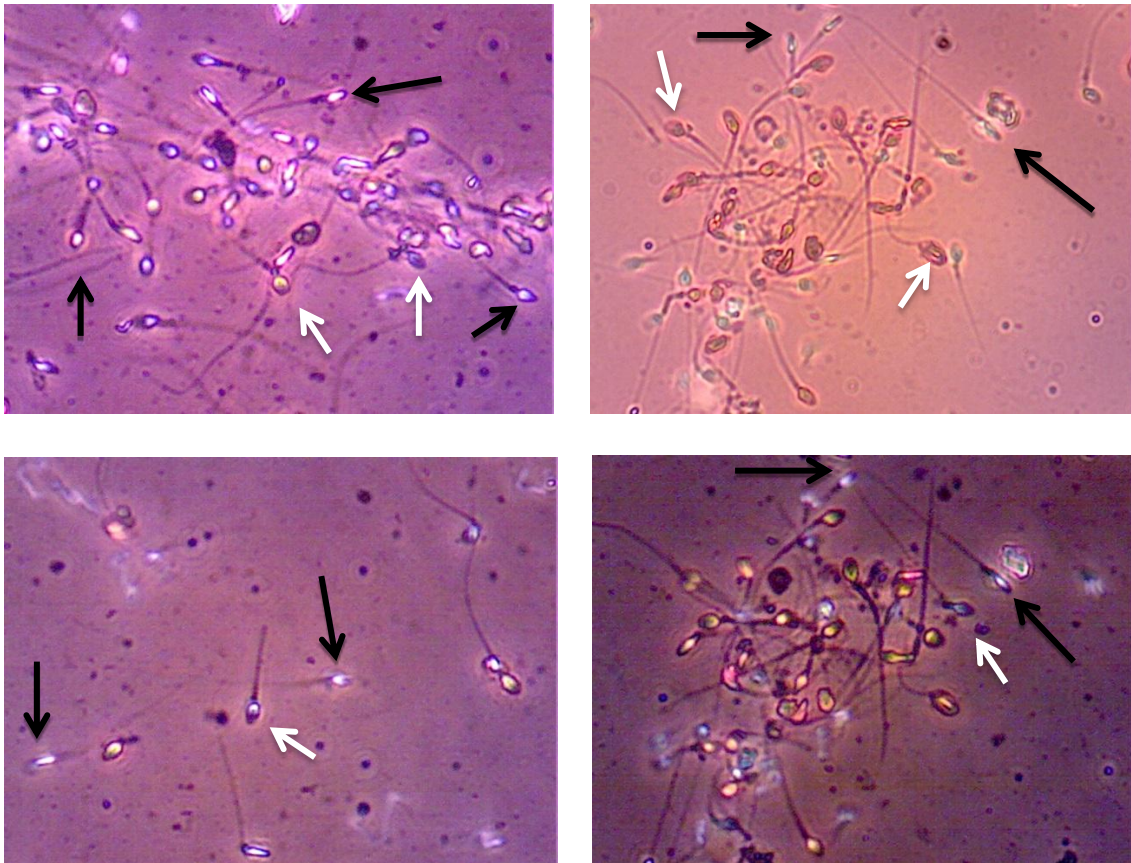


Figura 20. Imágenes de espermatozoides en la prueba de viabilidad celular por microscopía óptica a 40x, las células que presenta un color brillante son células vivas (flechas negras) y las células que se tiñeron (flechas blancas) presentan daño en su membrana celular.

En la fig. 20 se muestran imágenes de la prueba de viabilidad celular, en donde se señalan las células vivas (brillantes) y muertas (teñidas).

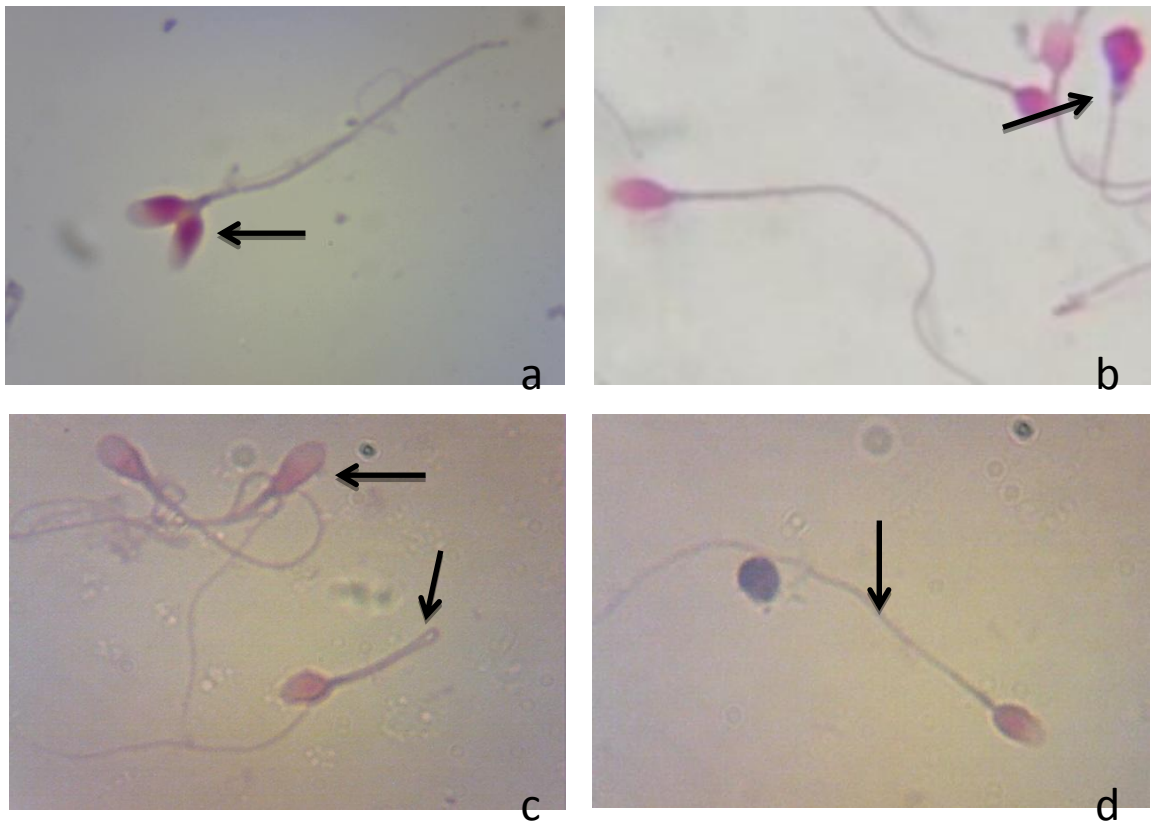


Figura 21. Imágenes de morfología espermática por microscopía óptica a 100x. a) Espermatozoide con defecto de cabeza, b) espermatozoide con defecto de pieza media, c) espermatozoides con defecto de flagelo y d) espermatozoides normales.

Cuando se analizó la morfología de los espermatozoides utilizados en este trabajo, se observaron células normales, células con defectos de cabeza, pieza media y flagelo (fig. 21).

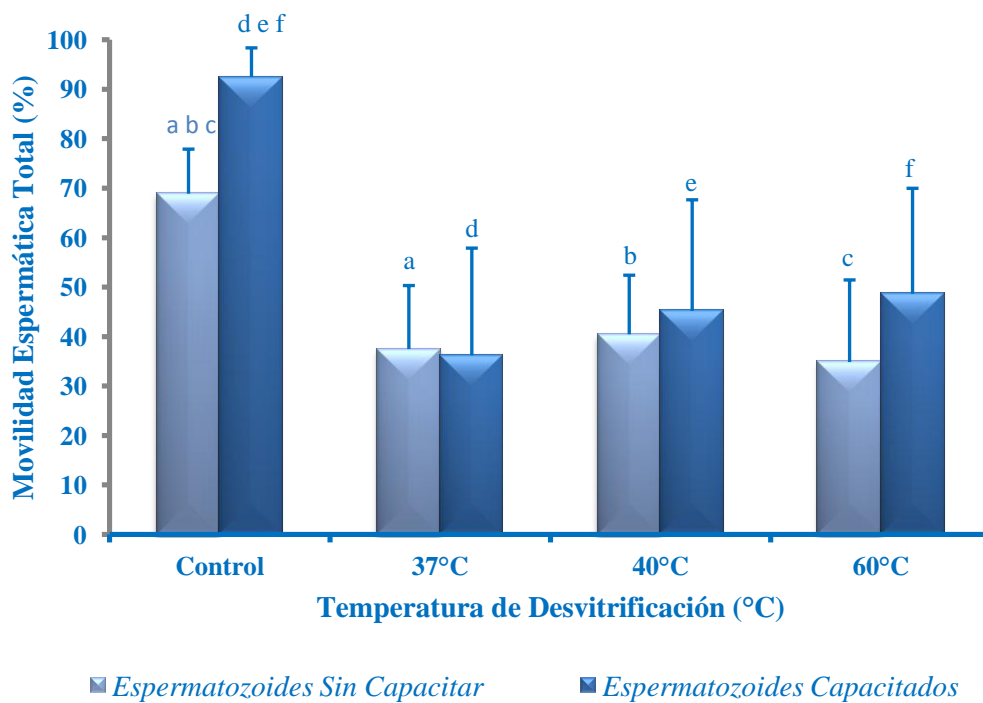


Figura 22. Grafica que representa los resultados obtenidos de la movilidad total de las células desvitrificadas a 37, 40 y 60°C. Se compara la movilidad de espermatozoides sin capacitar: a, b y c, y capacitados: d, e y f. Las letras iguales indican que los promedios de los valores son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Movilidad total

El porcentaje de movilidad total recuperada de los espermatozoides sin capacitar después de la desvitrificación a una temperatura de 37°C fue de 37.48 ± 12.84 , a 40°C fue de 40.45 ± 11.95 y a 60°C fue de 34.85 ± 16.60 . En estas tres

temperaturas las muestras al ser desvitrificadas, valores de los promedios no presentaron una diferencia significativa. Al comparar estos valores con el promedio obtenido en el grupo control (68.88 ± 9.0), se observó que existe una diferencia significativa al comparar el control y los valores obtenidos después de que las células fueron desvitrificadas ($p \leq 0.05$).

Para el caso de las muestras capacitadas y vitrificadas, el porcentaje de movilidad recuperado después de la desvitrificación a una temperatura de 37°C fue de 36.20 ± 21.68 , a 40°C fue de 41.18 ± 22.47 y a 60°C fue de 48.65 ± 21.32 . A estas tres temperaturas no existió diferencia significativa entre los valores promedios obtenidos de movilidad. Cuando se comparó los valores de estos tres grupos con la movilidad recuperada en espermatozoides capacitados antes de la vitrificación (92.45 ± 5.91), se observa que si existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) (control, fig. 22).

Al comparar los valores promedio de movilidad de las células desvitrificadas en las células capacitadas se observó que existe un incremento a 60°C (14%), que no fue significativo con respecto al valor de las células sin capacitar.

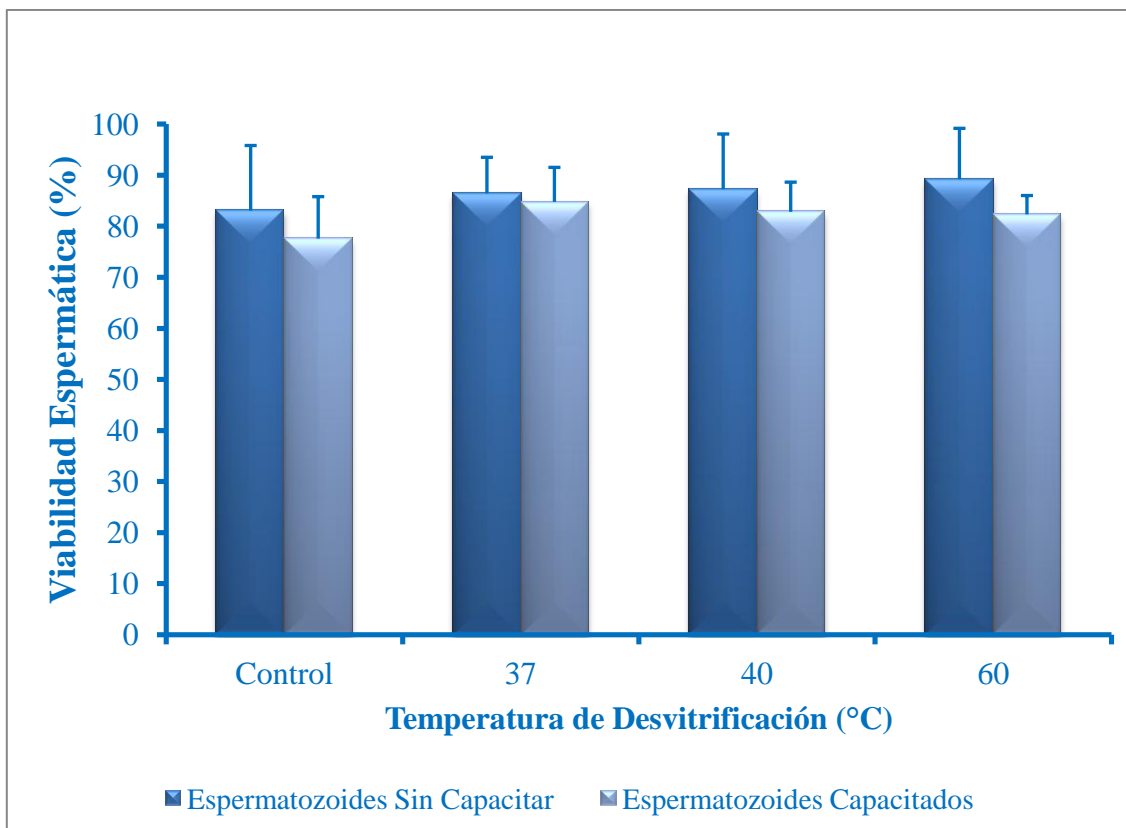


Figura 23. Gráfica que representa los valores promedio de la viabilidad celular, se comparan ambos grupos espermatozoides sin capacitar y capacitados. No se observan diferencias significativas, $p \leq 0.05$.

Viabilidad celular

El porcentaje de viabilidad celular recuperado después de la desvitrificación celular se mantiene, como se puede observar en la fig. 23. No existe variación de la viabilidad celular en ninguna de las temperaturas estudiadas (37, 40 y 60°C). No se presentaron diferencias significativas en la viabilidad celular entre los grupos de muestras espermáticas sin capacitar y capacitados (fig. 23).

Discusión

La criopreservación de espermatozoides humanos es una técnica utilizada para el mantenimiento de la fertilidad en el hombre, por medio de las técnicas de vitrificación y congelación.

Isachenko y cols., (2004), realizan una comparación entre la criopreservación de espermatozoides humanos al utilizar los métodos de congelación lenta y vitrificación en vapores de N₂ (L). Las muestras fueron capacitadas, se utilizó un crioprotector a base de yema de huevo/glicerol, se congelaron y vitrificaron con y sin crioprotector y posteriormente se desvitrificaron en medio SPM (suplemento con albumina de suero humana) a 37°C. Se reporta que existe una disminución de la movilidad hasta de 29 veces en la congelación convencional sin crioprotector a comparación del grupo fresco sin crioprotector. Por lo contrario la movilidad celular disminuyó aproximadamente 3 veces cuando las muestras fueron vitrificadas en presencia de un crioprotector. Al comparar el porcentaje de disminución de la movilidad de las muestras incubadas con crioprotector, vitrificadas y desvitrificadas fue de casi un 40% con respecto a la movilidad obtenida en las muestras frescas incubadas en presencia de un crioprotector. En contraste, en nuestro trabajo encontramos que la movilidad es disminuida en casi la misma proporción una vez que fueron desvitrificadas las muestras cuando les fue adicionada un crioprotector a base de yema de huevo y etilenglicol, indicando que la vitrificación no afecta de manera la movilidad celular de manera importante ya que se tuvo una disminución de 2.2 veces respecto al control de muestras capacitadas y de 1.8 veces respecto al control de muestras sin capacitar.

Isachenko y cols., (2004), realiza una comparación entre la criopreservación de espermatozoides humanos por vitrificación ultra-rápida y rápida (vapores de N₂L). Evaluó su efecto en la movilidad, integridad del ADN y viabilidad celular en la fertilización. En este trabajo nos menciona que los espermatozoides humanos pueden ser criopreservados sin la adición de un crioprotector además de ser capacitados. Una vez capacitados, vitrificados y desvitrificados en medio SPM a 37°C, se observó una disminución de hasta el 40% en la movilidad de los

espermatozoides, sin presentar una diferencia significativa entre ambos grupos (rápida y ultra-rápida). Si se obtuvo una diferencia significativa cuando estos valores se compararon con el valor del grupo de espermatozoides frescos. En nuestro trabajo encontramos una disminución de la movilidad en un 40% al comparar los espermatozoides capacitados, vitrificados (rápida) y desvitrificados (60°C) con respecto a su control obtenemos un valor similar al reportado en el trabajo de Isacheko y cols., además de tomar en cuenta que en nuestro estudio se utilizó un crioprotector a base de yema de huevo.

En cuanto a la viabilidad celular, Isachenko y cols., (2004), hace referencia a la capacidad fertilizante de los espermatozoides al realizar una fertilización in vitro de 35 ovocitos, obteniendo cigotos de dos a tres pronúcleos sin diferencias significativas entre los grupos de ovocitos que fueron fertilizados con espermatozoides provenientes de vitrificación rápida y ultra rápida. En cuanto al desarrollo de blastomeras, fue de 4-6 sin diferencia significativa en ambos grupos de ovocitos fertilizados con espermatozoides criopreservados por vitrificados rápida y ultra rápida. En los datos obtenidos en nuestro trabajo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular entre el grupo control y el experimental en donde las diferentes temperaturas de descongelación no afectaron la viabilidad celular cuando fue determinada por una tinción vital.

Isachenko y cols., (2008), realiza un estudio del estado acrosomal y la actividad mitocondrial en la vitrificación de espermatozoides humanos con sacarosa. Las muestras fueron capacitadas y como crioprotectores se utilizaron HTF, HTF y HSA o HSA con sacarosa 0.5 M. Los porcentajes obtenidos en la movilidad fue de un 19.4 ± 1.9 , 45 ± 3.7 y 57.1 ± 3.2 respectivamente. La movilidad se vio disminuida hasta un 60% para el caso del HTF y de aproximadamente 40% en las otras combinaciones. Con respecto a la viabilidad entre los tres grupos de crioprotectores no existieron diferencias estadísticamente significativas, al comparar estos valores con los del control (muestras frescas) si existió una diferencia estadísticamente significativa ya que la viabilidad disminuyó hasta un 60% aproximadamente. Al comparar estos resultados con los de nuestro trabajo,

obtuvimos una disminución en nuestra movilidad sin embargo nuestra viabilidad se mantuvo una vez que las muestras fueron desvitrificadas a cualquiera de las temperaturas experimentadas, por lo tanto podemos inferir que posiblemente el crioprotector a base de yema de huevo resulte benéfica para conservar la viabilidad celular cuando las células son vitrificadas rápidamente.

Berrios, S.O. y Sánchez G.R., (2011), realiza un estudio de congelación ultra rápida de espermatozoides humanos y estudia el efecto sobre la función espermática y producción de especies reactivas de oxígeno. Evaluó la movilidad y la viabilidad de espermatozoides humanos capacitados y vitrificados ultra rápidamente al utilizar sacarosa al 0.25 M como crioprotector. Obtuvo un porcentaje de movilidad progresiva antes y después de la vitrificación de un 94.3 ± 3.6 y 54.4 ± 7.6 respectivamente. Con respecto a la viabilidad antes y después de la vitrificación obtuvo un porcentaje de 95.8 ± 1.6 y 55.6 ± 5.6 respectivamente. En nuestro trabajo podemos observar que la movilidad obtenida después de la vitrificación y desvitrificación a una temperatura de 60°C de los espermatozoides capacitados disminuye en la misma proporción que en el estudio realizado por Berrios, S.O. y Sánchez G.R., 2011, sin embargo, la viabilidad se mantiene sin importar a que temperatura a la que hayan desvitrificado las muestras.

J. Zhu y cols., (2013), realizan un estudio de la criopreservación ultra rápida de espermatozoides humanos en viales criogénicos. En este trabajo nos mencionan que realizaron la criopreservación de espermatozoides humanos utilizando un crioprotector a base de sacarosa en concentraciones de 0.15 M, 0.20 M, 0.25 M y 0.30 M, por las técnicas de congelación convencional y vitrificación ultra-rápida, la desvitrificación se llevó a cabo en baño maría a 47°C durante un minuto, seguida de una incubación a 37°C . Los mejores resultados de motilidad progresiva, integridad de la membrana plasmática y del acrosomal del espermatozoide fueron obtenidos a una concentración de sacarosa de 0.20 M en que el grupo de congelación convencional ($58.5 \pm 6.3\%$). En cuanto a la integridad acrosomal encontraron que no hay diferencias significativas entre los grupos a diferentes concentraciones de sacarosa cuando se vitricaron, aunque existe una disminución

en comparación al grupo fresco. La integridad acrosomal se vio disminuida en el grupo criopreservado por congelación convencional en las diferentes concentraciones de sacarosa, sugiriendo que el método de vitrificación ultra rápida da mejores resultados cuando se usa como crioprotector sacarosa al 0.20 M en comparación a la congelación convencional. En nuestro trabajo, la viabilidad celular, una vez desvitrificadas las muestras, se mantuvo en el mismo porcentaje que en el grupo de semen fresco tomando en cuenta que crioprotector utilizado fue a base de yema de huevo.

Vizueté G. y cols., (2013), realizan un estudio de el efecto de la vitrificación en la motilidad progresiva y total, morfología e integridad en espermatozoides del epidídimo en el gato doméstico. Se utilizó como crioprotector como control DPBS (Dulbecco's Phosphato Buffered Saline) con BSA 1% y diferentes concentraciones de sacarosa (0.25 M, 0.40 M y 0.60 M) en el mismo medio. Las muestras se procesaron por vitrificación rápida y desvitrificaron a 65°C durante 5 segundos. Observaron una disminución en la movilidad total cuando se utilizó sacarosa a las diferentes concentraciones en comparación con grupo fresco (45.0 ± 4.8 vs 3.0 ± 3.0 , 9.2 ± 2.3 , 12.9 ± 3.9 , 6.7 ± 2.7 , respectivamente). La mejor recuperación de la movilidad se observó en la concentración de sacarosa 0.4 M. En la integridad del acrosoma no hubo diferencias en las diferentes concentraciones de sacarosa en ambos grupos. En este trabajo también mantuvimos los mismos porcentajes en la viabilidad celular, con la diferencia de que el estudio fue aplicado en espermatozoides humanos capacitados y un crioprotector a base de yema de huevo.

Conclusión

Se observa que el proceso de la vitrificación afecta la movilidad espermática una vez desvitrificadas y es independiente de la temperatura de desvitrificación y de igual forma si las células fueron capacitadas o no previamente a la vitrificación.

La movilidad de los espermatozoides capacitados disminuye en la misma proporción que la reportada en la literatura después de la vitrificación y desvitrificación a una temperatura de 60°C.

En cuanto a la viabilidad celular, no se ve afectada en este proceso y se mantiene con los mismos valores en ambos grupos después del proceso de vitrificación y desvitrificación a las diferentes temperaturas.

En la vitrificación rápida de los espermatozoides, la viabilidad se mantuvo en mejores porcentajes cuando se utilizó un crioprotector a base de yema de huevo, a diferencia de los valores obtenidos con sacarosa como lo reporta la bibliografía.

Perspectivas

Tomando en cuenta los resultados obtenidos de movilidad celular cuando los espermatozoides se criopreservaron con un crioprotector a base de yema de huevo, se recomienda aumentar la concentración espermática y utilizar tratamientos como la capacitación para posteriormente utilizar las células en las TRA de alta complejidad como el FIV. Para esta técnica son requeridos de 50 000 células con movilidad progresiva.

Debido al alto porcentaje de viabilidad celular recuperada después de la vitrificación se recomienda el uso de estas células criopreservadas por vitrificación rápida y yema de huevo como crioprotector en ICSI ya que solo es requerida una célula viable.

Bibliografía

Berrios, S.O., Sánchez, G.R. Congelación ultra rápida de espermatozoides humanos: efecto sobre la función espermática y producción de especies reactivas de oxígeno. *International Journal of Morphology*, 29, 3:899-906, 2011.

Bisioli, C. Criobiología de Gametos. *International Society of Gynecological Endocrinology. Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología, Ginecológica y Reproductiva*, 13, 2: 23-30, 2006.

Blanes, R., Fernández, P.J., Jiménez, A., Romeu, A. La Pentoxifilina como agente antioxidante en el proceso de criopreservación espermática. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 21, 4:237-245, 2004.

Bloom, W. and Fawcett, D.W. *Textbook of histology*, 10th Ed. Saunder, Philadelphia, 1975.

Chatterjee, S., Gagnon, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Molecular reproduction and developmen*, 59, 4:451-8, 2001.

Crister, J.K., Huse, A.R., Aaker, D.D., Arneson, B.W., Ball, G.D. Criopreservación of human spermatozoa. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertility Sterility*, 47:980-984, 1987.

Dym, M. 1997. The male reproductive system. In L. Weiss and R.O Greep (eds.), *Histology*, 4th Ed. McGraw-Hill, New York, pp 979-1038.

Fraser, A.F. Progress in the artificial isemination of sheep with frozen semen. 6th *International Congress Animal Reproduction, Artificial Insemination*. Paris., 2:1033-1038, 1968.

Gilbert, F. *Biología del desarrollo*. Editorial medica panamericana, 7a edición, 2006.

Graham, E., Crabo, B., Pace, M. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *Journal of Animal Science*, 47:80-119, 1978.

Heller, C.H., Clermont, Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Progress in Horm Research*, 20: 545-575, 1964.

Hunter, R.H. and Nichol, R. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cell in the caudal isthmus. *The Journal of experimental zoology*, 228, 1:121-128, 1983.

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schoendorf, T., Mallmann, P., Dessolet, S., Nawroth, F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 19, 4:932-939, 2004.

Isachenko, V., Isachenko E., Katkov I.I., Montang, M., Dessolet, S., Nawroth, F., Van der Ven H. Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity and Fertilization Ability. *Biology of Reproduction*, 71:1167–1173, 2004.

Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J.M., Kreienberg, R., Katkov, I.I., Schulz, M., Lulat, G-M.I., Risopatrón, M.J., Sánchez, R. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose., *Society for Reproduction and fertility*, 136:167:173, 2008.

MacLeod, J. The significance of deviation in human sperm morphology. In *The Human Testis*. Rosemberg, E., Paulsen, C.A. (Eds). New York, *Advances in experimental medicine and biology*, 10:481-494, 1970.

Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., Giraldo, C. El espermatozoide desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19:4, 2006.

Owen, H.D. and Katz, F.D. A Review of the physical and chemicals properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of Andrology*, 26:459-469, 2005.

Palacios, A. Espermatogenesis, En: *Fertilidad y reproducción asistida*, Eds., Urbina, M.T., Lerner Biber J. Editorial medica panamericana., 1a edición, 2009 pp. 101-114.

Pérez, E. Atención integral de la fertilidad, *Endocrinología, cirugía y reproducción asistida*. Editorial medica panamericana, 3a edición, 2011.

Polge, C., Smith, A., Parkes, A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 15:164-166, 1949.

Rall, W.F. and Fahy, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, 5:313-373, 1985.

Ross, M., Pawlina, W., *Histología, Texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial medica panamericana., 5a edición, 2009.

Salamon, S., Maxwell, WM. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37:185-249, 1995a.

Salamon, S., Maxwell, W.M. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 3-22, 2000.

Sellés, E., Salinas, N., Losa, B., Palomares, L. y Muños, M. Capacitación espermática, en: Manual práctico de esterilidad y reproducción humana., Eds. Remohí, J.A., Cobo, A.C., Prados, N., Romero, J.L., Pellicer, A. Editorial medica panamericana, 4a edición, 2012 pp. 21-25.

Sharma, R.K., Tolentino, M.V., Agarwaal A. Sperm kinematics of cryopreserved normozoospermic specimens after artificial stimulation. *Urology*, 47:77-81, 1996.

Reiriz, J. Sistema Reprodutor Masculino: Anatomía., Colegio oficial Infermería de Barcelona. Recuperado el 21 de Junio del 2011.

Sadler, T.W. Lagman embriología médica con orientación clínica. Editorial medica panamericana, 8a edición, 2001.

Stornelli, M.C., Tittarelli, C.M., Savignone, C.A., Stornelli, M.A. Efecto de los Procesos de Criopreservación Sobre la Fertilidad Seminal, *Analecta Veterinaria*, 25, 2:28-35, 2005.

Velázquez, C.G. Fisiología de la Reproducción Humana. *Revista Mexicana de la Reproducción*, 1,4:115-130, 2009.

Vizuite, G., Jiménez, E., Pérez, C.C., Agüera, E.I. Effect of vitrification on epidymal sperm motility, morphology and acrosome integrity in domestic cats., 135-147, en prensa.

Watson, P., and Martin I. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*, 28:99-101, 1972.

Watson, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7: 781-791, 1995.

World Health Organization, Manual de procedimientos. Laboratorio de reproducción asistida. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, 2006.

Yogev, L., Gamzu, R., Paz, G., Kleiman, S., Botchan, A., Hauser, R., Yavetz, H.
Pre-freezing sperm preparation does not impair spermatozoa binding to the zona
pellucida. *Human Reproduction*, 14, 1:114 -117, 1999.

Anexos

Anexo 1

Cuestionario

Datos del donante		
Código: _____	Fecha: _____	
Nombre: _____		
Edad: _____	Estatura: _____	Peso: _____
Ocupación: _____		
Alergia: _____		
Antecedentes genéticos (esterilidad, cáncer, hepatitis, diabetes): _____		
Drogas (especifique): _____		
Bebidas alcohólicas (especifique): _____		
Fumas: _____		
Estado civil: _____	Hijos: _____	
Días de abstinencia: _____		

Anexo 2

Human Tubal Fluid (HTF)

MEDIO HTF Simple(Human Tubal FLuid)			
Reactivo	mM	PM	g/L
NaCl	101.6	58.44	5.9000
KCl	4.70	74.55	0.3600
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20	246.47	0.0493
KH ₂ PO ₄	0.37	136.086	0.0500
CaCl ₂ (anhidro) "o"	2.04	110.98	0.2264
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.04	147.014	0.3000
NaHCO ₃	25.00	84.007	2.1000
Glucosa	2.78	180.16	0.5000
Piruvato de Sodio	0.33	110.0	0.036
Lactato de sodio	21.40	112.06	2.400
Penicilina-G	100UI/ml		0.060
Estreptomina-SO ₄	50 mg/ml		0.050
Rojo de Fenol			0.005
Osmolaridad 285 ± 5 mOsm/l, pH 7.3 – 7.4 (Bajo tensión de CO ₂ al 5%) Suplementar con suero al 10 o 15%			

El HTF fue modificado para ser usado sin tensión de CO₂. Para esto, el NaHCO₃ debe ser rebajado a 4.0 mM y agregar Hepes 25 mM. Llevar a pH 7.3-7.4 con NaOH 1 N. este medio se usa para suspender espermatozoides en ambientes sin CO₂, (World Health Organization., 2006).

