



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN
RATONES DE LA CEPA CD-1.**

Tesis para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

William Wilfrido Espinosa Cano

TUTORA:

Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna



NOVIEMBRE 2024

**“Si no hay dudas, no hay progreso”
Charles Darwin (1809-1882)**

Agradecimientos

A mi madre, quien desde el cielo me sigue guiando con su amor incondicional. Te debo todo lo que soy, cada sacrificio y cada consejo que me diste sigue siendo mi mayor fuente de fortaleza. Tu sabiduría y ternura siguen siendo el motor de mi vida.

A mi esposa, mi compañera de vida y apoyo inquebrantable. Gracias por tu amor, por tu paciencia, y por estar a mi lado en cada paso de este camino. Eres la razón por la que encuentro fuerza aún en los momentos más difíciles.

A mi hija, la joya de mi vida. Tu alegría y tu presencia me dan esperanza y me recuerdan que todo esfuerzo tiene un propósito. Gracias por ser mi inspiración diaria y por darme tanto amor.

A mis hermanos, quienes siempre han estado ahí para apoyarme, en los buenos y malos momentos. Su solidaridad, su comprensión y su aliento constante son un regalo invaluable que me acompaña en todo momento.

A Dra. Rosalinda Reyes Luna, por su dedicación, paciencia y compromiso con mi formación. Su guía y sus consejos fueron fundamentales para que pudiera llegar hasta aquí. Gracias por tu profesionalismo y por siempre tener un espacio para ayudarme.

A la Maestra Monserrat Vázquez Balbuena quienes con su tiempo, conocimientos y críticas constructivas han enriquecido este trabajo. Les agradezco profundamente por su atención y aportes que sin duda han fortalecido este proyecto.

Al Dr. Ubaldo Quiroz López, por su tiempo, dedicación y valiosas recomendaciones. Su retroalimentación ha sido esencial para mejorar este trabajo, y le agradezco sinceramente por su apoyo y contribución.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

ADN: Ácido desoxirribonucleico

TRA: Técnicas de reproducción asistida

OMS: Organización Mundial de la Salud

pH: Potencial de Hidrogeno

FSH: Hormona Folículo Estimulante

LH: Hormona luteinizante

S-S: Enlace azufre-azufre

ROS: Espécies reactivas de oxigeno

SCSA: Ensayo de estructura de cromatina espermática

SCDt: Prueba de dispersión de cromatina espermática

G: Glicerol

DMSO: Dimetilsulfóxido

EG: Etilenglicol

PG: Propilenglicol

PEG: Polietilenglicol

PVP: Polivinilpirrolidona

ICSI: Inyección intracitoplasmática

RESUMEN

La criopreservación, es una técnica que implica el almacenamiento de células en vida latente a temperaturas extremadamente bajas, en el área de la reproducción. Las técnicas de reproducción asistida son utilizadas para la conservación de ovocitos, espermatozoides y embriones, en el humano, para la producción de animales de importancia económica, así como especies en peligro de extinción. No obstante, uno de los principales retos de este proceso es preservar la integridad y viabilidad celular después de la congelación y descongelación de las muestras. Otro factor importante a determinar es el impacto de la criopreservación sobre la fragmentación del ADN espermático, ya que influye directamente en el desarrollo embrionario.

En el presente estudio se evaluaron dos técnicas de vitrificación (rápida y ultrarrápida) con el uso de etilenglicol y sacarosa como crioprotectores que evitan la formación de cristales de hielo en las células. En espermatozoides de ratones de la cepa CD-1 se determinó si estas técnicas mantenían la viabilidad mediante una prueba de integridad de membrana, la movilidad por microscopía óptica y la integridad del ADN espermático por medio del ensayo Cometa.

Los resultados obtenidos indicaron que, ambas técnicas de vitrificación permiten conservar la integridad del ADN, no obstante, la movilidad de los espermatozoides se vio drásticamente reducida. Esto indica que, si bien la vitrificación preserva la integridad de la estructura genética de los espermatozoides, el mantenimiento de su movilidad constituye un desafío que aún requiere mayor investigación en el caso de los espermatozoides de ratón.

En conclusión, el uso de etilenglicol y sacarosa como crioprotectores y la vitrificación rápida y ultrarrápida demuestran ser eficientes para preservar la integridad del ADN en espermatozoides de ratones (*mus musculus*) CD-1. Sin embargo, se requiere perfeccionar las condiciones para mejorar la movilidad después de la desvitrificación en estos espermatozoides.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	6
INDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	8
1.1 Espermatogénesis	10
1.2 ADN Espermático	11
1.4 Ensayo COMETA.....	13
1.5 Criopreservación.....	14
1.5.1 Vitriificación	15
1.6 Crioprotectores.....	16
1.6.1 Crioprotectores Permeables	17
1.6.2 Crioprotectores No Permeables.....	18
1.6.3 Etilenglicol y sacarosa como crioprotectores	19
1.7 Ratón (<i>mus musculus</i>) como modelo experimental	20
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo General	25
5.2. Objetivos Particulares	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6. 1 Obtención de espermatozoides:.....	27
6. 2 Seminograma	27
6. 2.1 Movilidad.....	28
6.2.2 Viabilidad	28
6. 2.3 Concentración.....	29
6. 3 Criopreservación.....	30
6.3.1 Selección de espermatozoides por Swim-up.....	30
6.3.2 Vitriificación Rápida.....	31
6.3.3 Vitriificación Ultrarrápida	32

6.4 Desvitrificación	33
6.5 Ensayo Cometa.....	34
6.5.1 Preparación de la muestra para la electroforesis.....	35
7. RESULTADOS	37
7.1 Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad espermática.	37
7.2 Efecto de la vitrificación sobre la movilidad espermática.	38
7.3 Efecto de la criopreservación sobre la integridad del ADN del espermatozoide	39
8. DISCUSIÓN	40
8.1 Efectividad del etilenglicol como crioprotector intracelular.....	41
8.2 Sacarosa como estabilizante osmótico	41
8.3 Beneficios y limitaciones de la vitrificación rápida y ultrarrápida	42
9. CONCLUSIÓN.....	43
10. BIBLIOGRAFÍA	44
11. ANEXO	49

INDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Espermatogénesis. (Tomado de Quintero et al. 2015).....	10
Figura 2. Crioprotectores permeables. (Tomado de Boiso, 2001).....	17
Figura 3. Crioprotectores no permeables. (Tomado de Boiso, 2001).....	19
Figura 4. Incubación de espermatozoides.....	27
Figura 5. Evaluación de movilidad y viabilidad de espermatozoides teñidos con colorante eosina nigrosina.....	29
Figura 6. Cámara de Neubauer.....	30
Figura 7. Vitrificación rápida.....	31
Figura 8. Perlas formadas por vitrificación rápida	32
Figura 9. Perlas formadas por vitrificación ultrarrápida	33
Figura 10. Desvitrificación.	33
Figura 11. Geles de agarosa.....	34
Figura 12. Cámara de electroforesis.	36
Figura 13. Evaluación de la fragmentación de ADN espermático con la prueba COMETA.....	37
Gráfica 1. Viabilidad espermática.....	38
Gráfica 2. Movilidad espermática.	39
Figura 14. Prueba COMETA en muestras desvitrificadas Rápida y Ultrarrápida ..	40

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual podría definirse en esencia como el fenómeno por el cual dos células más o menos diferenciados gametos o simplemente dos núcleos en algunos casos, se aparean y se fusionan. Probablemente la ventaja más importante de la reproducción sexual es el aumento de variabilidad que resulta de la fusión del material hereditario de dos organismos: los progenitores. Y que conduce a la aparición de un nuevo organismo, semejante pero no idéntico a ellos (Jordana & Herrera.1974). Esta variabilidad tiene una gran importancia evolutiva, debido a que se producen dentro de la especie individuos distintos, capaces de adaptarse por largos períodos a nuevos cambios en el medio ambiente (Nelson, 1973).

La reproducción sexual, a pesar de que requiere una secuencia de procesos bastante complejos, respecto a los mecanismos más sencillos que se efectúan en la reproducción asexual, se extiende a todos los seres vivos, desde los organismos unicelulares a los pluricelulares más evolucionados (plantas y animales superiores). En estos últimos tiene lugar la especialización de células destinadas a aparearse, que son los gametos. En los primeros en cambio, el gameto no se distingue morfológicamente de la simple célula vegetativa, por lo que es necesaria la aplicación de otro criterio distinto al de la diferenciación celular, que es la dotación cromosómica. La fusión de los núcleos idénticos conduce a la duplicación de la dotación cromosómica. Pero para que se mantengan constantes las características nucleares de la especie, es indispensable que, en un momento u otro, tenga lugar la reducción a la mitad de esta dotación cromosómica, que es precisamente el papel de la meiosis. El ciclo de reproducción sexual de cualquier organismo se presenta por tanto como la sucesión de dos fases complementarias: una haplofase (n número de cromosomas) y una diplofase ($2n$ cromosomas) (Lamotte, 1975).

1.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el mecanismo encargado de la producción, crecimiento, maduración y empaquetamiento del ADN de las células germinales masculinas. Se inicia a partir de espermatogonias que son células diploides y el proceso termina con los espermatozoides maduros, haploides. Las espermatogonias se someten a la meiosis para formar espermatocitos primarios, éstos inician la primera división meiótica y dan origen a los espermatocitos secundarios, que se diferenciarán en espermátidas después del término de la segunda división meiótica. Las espermátidas se pueden dividir en tres categorías: las primeras espermátidas se caracterizan por poseer núcleos redondos, las espermátidas intermedias tienen núcleos alargados, y las espermátidas maduras adquieren núcleos condensados (Dadoune, 2003). Posteriormente estas espermátidas sufrirán diferenciación en espermatozoides y a este proceso se le denomina espermiogénesis (Figura1). Cada espermatozoide consiste en un núcleo haploide, un sistema de propulsión para impulsarlo y un saco de enzimas denominado acrosoma que le permite al núcleo penetrar la zona pelúcida del gameto femenino durante la fecundación (Gilbert, 2006).

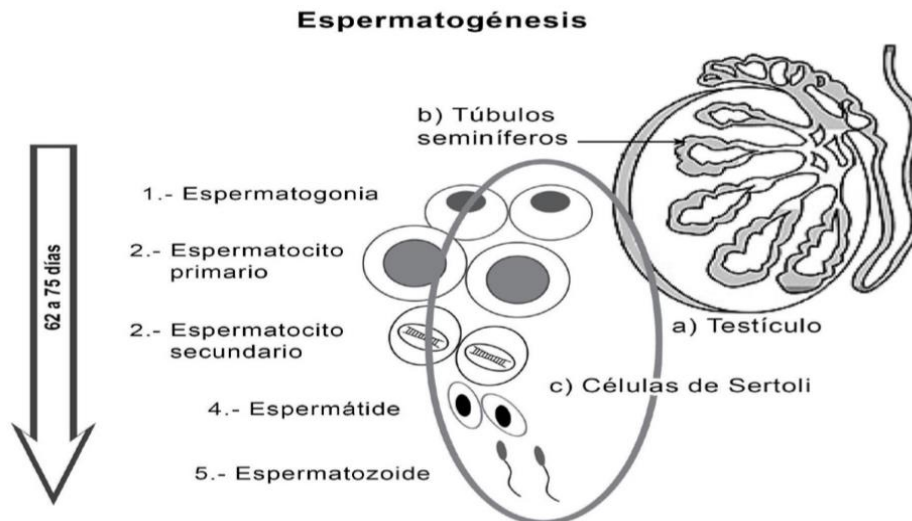


Figura 1. Espermatogénesis. La espermatogénesis se lleva a cabo en los b) túbulos seminíferos con la participación de las células de Sertoli, c) que se encuentran ubicados en los a) testículos. 1) En la fase de proliferación, las espermatogonias se dividen mitóticamente y 2) originan espermatocitos primarios. 3) Durante la meiosis I, el espermatocito primario se divide originando dos

espermaticos secundarios, reduciendo el número cromosómico de diploide a haploide. 4) Durante la meiosis II, el espermatico secundario se divide originando dos espermáticas 5) y finalmente las espermáticas mediante un proceso de diferenciación celular (espermiogénesis) dan lugar a los espermatozoides (Tomado de Quintero *et al.*, 2015).

La espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos localizados en los testículos. Inicia en la pubertad y tiene una duración aproximada de 62 a 75 días en la especie humana. Durante el desarrollo fetal, la creación de gametos está en reposo, pero tras el incremento de la concentración de hormonas gonadotróficas (FSH y LH) que generalmente se producen en la pubertad, las células de Leyding secretan testosterona y así da comienzo la espermatogénesis (Temboury, 2009). El proceso se mantiene activo durante toda la vida, aunque en los individuos seniles se ha descrito un descenso en la producción de espermatozoides. Cada uno de estos pasos representa un elemento clave en el proceso de la espermatogénesis. Los defectos que se producen en cualquiera de ellos pueden resultar en el fallo de todo el proceso y conducir a la producción de espermatozoides defectuosos y a la reducción o ausencia de espermatozoides (De Kretser *et al.*, 1998).

1.2 ADN Espermático

La condensación de la cromatina comienza durante la espermiogénesis. La espermiogénesis es el proceso de diferenciación que sufren las células germinales primitivas hasta llegar a convertirse en espermatozoides maduros y ocurre en un proceso de 2 pasos (Oliva & Dixon, 1991). En el primer paso, las proteínas nucleares de transición (TP1 y TP2) reemplazan a las histonas de células. En el segundo paso, durante la etapa de espermática alargada, unas proteínas espermáticas, conocidas como protaminas (P1 y P2), reemplazan a las proteínas de transición (Aoki *et al.* 2005). Las protaminas son las proteínas más abundantes en el espermatozoide maduro y empaquetan el genoma paterno dentro del núcleo espermático. Tanto la P1 como la P2 son fundamentales para la correcta condensación de la cromatina. Estas proteínas, ricas en arginina y residuos de cisteína, facilitan la estabilidad del

ADN al formar enlaces disulfuro (S-S); la gran cantidad de arginina provee una fuerte carga positiva facilitando su unión al ADN y garantizando el reemplazo de las histonas y las proteínas de transición nuclear. Los múltiples residuos de cisteína son oxidados para formar puentes disulfuros (S-S) entre las protaminas y estabilizar la cromatina durante los estadios finales de la maduración espermática, de esta forma proporcionan una gran estabilidad al núcleo del espermatozoide, esto hace que el ADN del espermatozoide esté seis veces más condensado que el de los cromosomas mitóticos y así el material genético esté protegido durante su travesía a lo largo de los aparatos genitales masculino y femenino (Quintero *et al.*, 2015).

1.3 Fragmentación de ADN espermático

El análisis seminal clásico, que consiste en el recuento de espermatozoides, la determinación de la motilidad, viabilidad y la morfología, ha sido la columna vertebral para el diagnóstico de la infertilidad masculina relacionada con la calidad del semen durante muchas décadas. Sin embargo, ha habido numerosos casos en los que estos parámetros están todos dentro del rango "normal", pero el factor masculino persiste en la reducción y/o el fracaso del embarazo (Irvine *et al.*, 2000; Evenson, 2016).

En cualquier etapa del proceso de la espermatogénesis se puede producir un daño en el ADN espermático, éste es un fenómeno multifactorial y no del todo dilucidado que puede afectar tanto al ADN mitocondrial como al nuclear, y puede ser inducido por 5 mecanismos principales: 1) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis; 2) roturas de ADN producidas durante el remodelado de la cromatina que tiene lugar durante el proceso de espermiogénesis; 3) fragmentación de ADN a nivel posttesticular inducida por radicales libres (ROS) y caspasas/endonucleasas durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo; 4) fragmentación de ADN inducida por caspasas y endonucleasas espermáticas, y 5) fragmentación de ADN inducida por radio y quimioterapia. De

estos 5 mecanismos, quizás el que juega un papel más importante sea la fragmentación de ADN a nivel posttesticular durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo. Esto es respaldado por estudios previos que demuestran que la fragmentación de ADN es más alta en espermatozoides del epidídimo y eyaculados que en espermatozoides testiculares (Greco *et al.*, 2005).

En las últimas dos décadas se han diseñado pruebas para medir la fragmentación del ADN espermático y predecir el efecto que ocasiona en el proceso de fertilización ya sea tras concepción natural o por reproducción asistida. Para su determinación se han desarrollado métodos directos e indirectos, los métodos directos incluyen la técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) y el ensayo Cometa con pH neutro; (Singh *et al.*, 1989) y los indirectos comprenden: prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD), el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA), ensayo de naranja de acridina (AO) y ensayo Cometa con pH alcalino (Velez de la Calle *et al.*, 2008).

1.4 Ensayo COMETA

El ensayo de cometa o electroforesis en gel de células individuales es un método sensible, rápido y relativamente de bajo costo para cuantificar daño en el ADN de células individuales. Puede ser realizado bajo condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del ADN, o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de cadena simple del ADN. En esta técnica las células son embebidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, sometidas a lisis mediante un agente reductor de grupos sulfhidrilo de las protaminas y posteriormente corridas por electroforesis durante un corto tiempo. Consecutivamente el microgel es teñido con fluorocromos. Las células con mayor daño del ADN muestran una migración desde el núcleo hacia el ánodo (Fairbairn *et al.*, 1995) y generan una imagen similar a la cola de un cometa. Los espermatozoides que no presentan fragmentación no generan esta imagen. La importancia de este ensayo radica en la posibilidad de

poder detectar fragmentación de cadena simple o doble del ADN espermático ya que cada una de ellas tiene un impacto diferente en el desarrollo embrionario. Se sugiere que la fragmentación de doble cadena es aquella “no reparable” por el ovocito, mientras que la simple podría llegar a ser reparada por un ovocito sano y joven (Derijck *et al.*, 2008).

1.5 Criopreservación

El estudio de las técnicas de criopreservación ha dado excelentes resultados principalmente en células germinales como óvulos y espermatozoides, así como embriones y tejidos de algunas especies, por lo que es deseable su adecuada implementación tanto por razones biológicas como por razones comerciales.

La criopreservación mantiene los tejidos a una temperatura entre los -140 y -196°C, tiene como objetivo la conservación y mantenimiento de los espermatozoides sin perder su capacidad de fertilidad y viabilidad a bajas temperaturas, en este rango de temperatura la célula no presenta actividad biológica, se produce un estado de "animación suspendida" del tejido que puede mantenerse indefinidamente (Fuller & Paynter, 2004). Las células y tejidos criopreservados pueden soportar el almacenamiento durante siglos con casi ningún cambio en la funcionalidad o la información genética, haciendo de este almacenamiento un método altamente atractivo. No obstante, la mayoría de las células mamíferas mueren cuando se exponen a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido expuestas a una solución que las proteja y a diferentes velocidades de enfriamiento y calentamiento específicos (Shaw *et al.* 2000; Rall *et al.* 1985).

El mayor desafío que las células debe soportar durante la criopreservación es la letalidad de una zona intermedia de temperatura (+15 a -15 °C) en donde se produce la formación de cristales de hielo en su interior, lo que pueda hacerlas estallar; otro problema es que las células deben pasar por ese intervalo dos veces (una durante la congelación y otra durante la descongelación) (Mazur, 1984).

1.5.1 Vitricación

Dentro de la criopreservación existen técnicas de refrigeración, congelación, y en las últimas décadas se desarrolló la vitricación, siendo esta última la más exitosa para la preservación de células espermáticas debido a su eficacia por evitar la formación de cristales de hielo que pueden dañar la membrana plasmática.

La vitricación se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo, sólido, sin la formación de cristales, es decir que, debido al rápido descenso de temperatura, la “viscosidad” de la muestra aumenta hasta un punto en que las moléculas se inmovilizan. De esta forma, se encuentran en un estado sólido, aunque su estructura molecular sea la de un líquido extremadamente viscoso (estado vítreo) (Critser *et al.*, 1997). Este aumento extremo de la viscosidad requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a 2500°C/min) o elevadas concentraciones de crioprotectores (de 5 a 7 M) (Shaw *et al.*, 2000; Vajta *et al.*, 2000).

Los protocolos de vitricación rápida y ultrarrápida utilizan altas concentraciones de solutos (crioprotectores y azúcares) que eliminan rápidamente el agua de las células. En estas soluciones, las células se deshidratan rápidamente y se favorece la entrada de los crioprotectores a su citoplasma, lo que permite sumergirlas directamente en nitrógeno líquido (vitricación ultrarrápida) o vapores de nitrógeno (vitricación rápida). Las tasas de congelación conseguidas con las técnicas ultrarrápidas (11000 a 14000°C/min) disminuyen drásticamente el daño por enfriamiento, permitiendo usar soluciones crioprotectoras menos concentradas (menos tóxicas) y acortar el tiempo de exposición de la célula en el crioprotector (Martino *et al.*, 1996)

La vitricación presenta numerosas ventajas como la eliminación total de la formación de hielo o la disminución del daño causado por el enfriamiento, puesto que atraviesa el rango de temperatura de +15 a -5°C a velocidades de enfriamiento muy rápidas (Martino *et al.*, 1996; Isachenko *et al.*, 1998; Zeron *et al.*, 2000). Otra

gran ventaja de esta técnica es que no requiere de equipos de congelación caros o sofisticados y puede ser realizada de manera muy sencilla.

La consecuencia negativa de esta estrategia radica en el incremento de las probabilidades de lesionar las células debido al choque osmótico y a la toxicidad de los crioprotectores. Sin embargo, se han aplicado diferentes protocolos para intentar disminuir estos efectos negativos, como el uso de crioprotectores menos tóxicos o la combinación de crioprotectores (disminuyendo la toxicidad individual de cada uno, pero manteniendo las propiedades osmóticas y crioprotectoras), la utilización de crioprotectores por etapas y/o la utilización de soluciones concentradas preenfriadas (Vajta *et al.*, 2000).

1.6 Crioprotectores

Las células, al ser congeladas, necesitan ser deshidratadas parcialmente a fin de evitar la formación de cristales que lesionan las estructuras citoplasmáticas (Mazur *et al.*, 1984). Esta deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación.

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (García & Vila, 1984), previniendo de esta forma el estrés osmótico. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará la máxima concentración de solutos a una menor temperatura, de forma que los espermatozoides estarán más deshidratados y el estrés osmótico al que estarán sometidos será menor (Boiso, 2001). De esta manera, los agentes crioprotectores previenen la formación de hielo intracelular debido a que aumentan la deshidratación celular (Medeiros *et al.*, 2002).

Los crioprotectores se clasifican en dos grandes grupos: crioprotectores permeables y no permeables, de acuerdo a la permeabilidad que exhiben a través de la membrana plasmática del espermatozoide.

1.6.1 Crioprotectores Permeables

Son sustancias permeables a través de la membrana debido a su de bajo peso molecular. Protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta (García & Vila, 1984). Si bien el espermatozoide es permeable a estos agentes, su permeabilidad no es de la misma magnitud a la del agua. Sin embargo, atraviesan la membrana plasmática reemplazando el volumen de agua que se encuentra dentro de la célula. Consecuentemente, evitan los daños producidos por la formación de cristales de agua en el interior de la célula y mantienen el volumen celular, evitando el colapso de los espermatozoides por una deshidratación excesiva, sin embargo, los crioprotectores permeables pueden ser tóxicos para los espermatozoides, porque inducen alteraciones en la membrana plasmática y disminuyen la motilidad espermática (Medeiros *et al.*, 2002).

Dentro de esta clasificación se encuentra el Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando en esta para ayudar a proteger los organelos de la célula. (Figura 2)

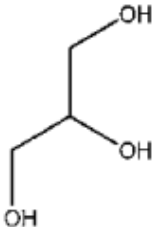
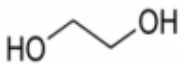
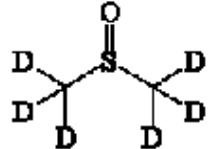
	Glicerol	Etilenglicol	Dimetilsulfóxido
Fórmula química	$C_3H_5(OH)_3$	$(CH_2OH)_2$	$(CH_3)_2SO$
Estructura química			
Peso molecular	92,10	62,07	78,13
Densidad	1,25	1,10	1,11

Figura 2. Crioprotectores permeables. Características bioquímicas de crioprotectores permeables (Tomado de Boiso, 2001)

1.6.2 Crioprotectores No Permeables

Son sustancias de alto peso molecular que no puede atravesar la membrana plasmática y que son efectivas cuando se emplean altas velocidades de congelación. Como no penetran en la célula, no son crioprotectores propiamente dichos, pero ejercen su acción promoviendo la deshidratación celular. Estos agentes suelen usarse en combinación con los agentes permeables (Boiso, 2001). Los agentes crioprotectores no permeables como azúcares también han sido estudiados en la congelación de semen ovino (Salomon & Maxwell, 2000).

Su mecanismo de acción consiste en estimular osmóticamente una rápida deshidratación celular y de esta manera disminuir el volumen de agua intracelular que podría formar cristales de hielo (Medeiros *et al.*, 2002). También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas. Por lo tanto, reducen la formación de cristales de hielo.

Además, estos azúcares pueden interactuar con la membrana formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana plasmática. Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw *et al.*, 1993). Los más utilizados son la sacarosa, la trehalosa, la lactosa y la rafinosa (Boiso, 2001) (Figura 3). En esta clasificación se encuentran, además, la polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano, sorbitol y otros azúcares, (Sommerfeld & Nieman, 1999).

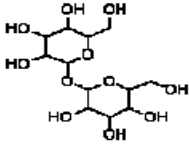
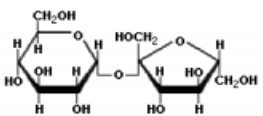
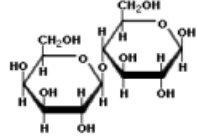
	Trehalosa	Sacarosa	Lactosa
Nombre	O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosida	O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructuofuranosido	O- β -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucopiranososa
Fórmula química	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Estructura química			
Peso molecular	342.30 g/mol	342.30 g/mol	342.30 g/mol

Figura 3. Crioprotectores no permeables. Características fisicoquímicas de crioprotectores no permeables (Tomado de Boiso, 2001).

1.6.3 Etilenglicol y sacarosa como crioprotectores

Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra- y extracelular durante el proceso. Además, no deben ser tóxicos para las células. Para reducir el daño osmótico y tóxico del crioprotector, debido a su alta concentración, se ha dejado de utilizar Glicerol y DMSO para reemplazarlos por el uso de Etilenglicol (EG), solo o en combinación con sacarosa o trehalosa ya que han demostrado ser menos tóxicos (Dochi *et al.*, 1990; Leeuw *et al.*, 1993). Dado su bajo peso molecular, el EG tendría una mayor velocidad de penetración y, por ende, necesitaría menor tiempo de exposición, disminuyendo su efecto tóxico (Saha *et al.*, 1996).

En el presente trabajo se utilizará una mezcla de crioprotectores, consistente en glucosa (no permeable) y etilenglicol (permeable) con el fin de obtener un buen porcentaje de espermatozoides viables y móviles post-descongelación.

1.7 Ratón (*Mus musculus*) como modelo experimental

El avance del conocimiento biológico y el desarrollo de mejores medios para la protección de la salud y el bienestar, tanto del hombre como del animal, requieren recurrir a la experimentación en animales vivos intactos de una gran variedad de especies. El conocimiento biológico obtenido en animales es extrapolable a los seres humanos dado que todos los animales descienden de antepasados comunes, por lo que los seres humanos son biológicamente muy similares a otros mamíferos. Todos los mamíferos, incluidos los seres humanos, tienen los mismos órganos: corazón, pulmones, riñones, hígado etc., que funcionan fundamentalmente de la misma manera, controlados a través de la circulación sanguínea y el sistema nervioso. Por lo que, el uso de modelos animales en la investigación biomédica es esencial para el desarrollo de tratamientos ante las enfermedades, es por eso que en el presente trabajo se utilizarán ratones (*Mus musculus*) de la cepa CD-1 como modelo animal y para poder extrapolar los datos obtenidos para los seres humanos.

Las ventajas del uso del ratón como modelo animal para este trabajo son:

1. Por su fácil cuidado y mantenimiento
2. Pequeño tamaño
3. Bajo costo de manutención
4. Cepa definida
5. Eficiencia reproductiva
6. Por su vida relativamente corta (4.5 años).

La eutanasia es necesaria en este trabajo, pero será importante evitar la muerte superflua de organismos. El sacrificio se realizará por métodos humanitarios, el con el menor sufrimiento físico y mental posible, eligiendo el método que induzca una inconsciencia rápida y muerte sin dolor ni estrés de acuerdo con su especie y estado, en concordancia con lo establecido por el *Report of the AVMA Panel on Euthanasia*.

2. ANTECEDENTES

Se estima que aproximadamente del 15 al 20% de todas las parejas experimentan infertilidad en algún momento de su vida reproductiva y aproximadamente la mitad de los casos las causas son de origen masculino (Quintero *et al.* 2015). La opción más utilizada para evaluar la infertilidad masculina es el análisis seminal, que aporta información de la calidad de la espermatogénesis.

Durante las últimas décadas, el análisis seminal convencional ha recibido muchas críticas e, incluso, algunos autores lo han catalogado como obsoleto, sobre todo después de la introducción de técnicas como la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). No obstante, la mayoría de los expertos en el campo de la andrología coincide en que el análisis básico del semen es, y seguirá siendo, el estudio principal y decisivo en la evaluación de la infertilidad masculina (Calull *et al.*, 2017).

La integridad del ADN espermático es una importante característica para tener descendencia. Por tanto, el análisis de la fragmentación del ADN espermático debe aplicarse como parte integral de la evaluación de la infertilidad masculina (Portella & Gonzales, 2016). Diversos estudios han demostrado que los espermatozoides humanos exhiben una alta tasa de daño en el ADN y que este se acentúa en condiciones patológicas que conducen a infertilidad. La transferencia de la molécula del ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo es crucial para conseguir una fecundación con perspectivas de éxito, por lo que se ha demostrado que las alteraciones en el ADN están asociadas con menores tasas de fecundación e incrementos de pérdidas del embarazo. Por tal motivo, muchas parejas que no han podido concebir de manera natural han tenido que recurrir a técnicas de reproducción asistida.

Isachenko *et al.* (2004) compararon la congelación lenta convencional y la vitrificación de espermatozoides humanos con y sin crioprotector para evaluar la

motilidad e integridad de ADN después de la descongelación. Los espermatozoides fueron seleccionados por la técnica *swim-up*, se formaron cuatro grupos: dos para congelación lenta sin y con crioprotector hecho de yema de huevo/glicerol y dos grupos para vitrificación con y sin crioprotector, así como también se evaluó la integridad del ADN por medio de una prueba cometa. Los resultados encontrados por ellos fueron mayor movilidad en la congelación lenta con crioprotector y mayor movilidad en la vitrificación sin crioprotector; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos sobre la integridad de ADN por lo que concluyeron que la vitrificación de espermatozoides humanos en ausencia de crioprotectores es factible.

Berrios & Sánchez (2011) evaluaron el efecto de la congelación ultrarrápida (vitrificación) sobre la función espermática de 10 donantes normozoospermicos. Los espermatozoides se seleccionaron por *Swim-up* y la solución espermática se dividió en dos fracciones. Una fracción se vitrificó sumergiéndola directamente en nitrógeno líquido mientras que la segunda se utilizó como control. En ambas fracciones se determinaron la viabilidad, movilidad, potencial de membrana mitocondrial (YMMit), integridad del ADN, reacción acrosomal espontánea e inducida, y superóxido intracelular (O_2^-). Observaron que la vitrificación preserva una adecuada función celular (viabilidad y movilidad) en un alto número de espermatozoides, siendo además un método simple, rápido y de menor costo, ya que no necesita equipo de congelación.

Sandoval et al. (2007) evaluaron el efecto de tres diluyentes y cuatro combinaciones de dos agentes crioprotectores permeables más dos no permeables sobre la calidad del semen ovino post-descongelamiento. En este trabajo se evaluaron las siguientes combinaciones de agentes crioprotectores permeables y no permeables: 1) Glicerol - Trehalosa, 2) Glicerol - Sacarosa, 3) Etilenglicol - Trehalosa y 4) Etilenglicol - Sacarosa. En este ensayo se encontró que la motilidad progresiva, la viabilidad e integridad acrosomal, la termoresistencia y la integridad

de membrana plasmática postdescongelamiento fue mejor en los grupos con glicerol-sacarosa y glicerol-trehalosa en comparación con los grupos con etilenglicol-sacarosa y etilenglicol-trehalosa. Esto demuestra que el glicerol es un mejor crioprotector permeable en comparación con el etilenglicol; sin embargo, no hubo diferencia en el uso de sacarosa o trehalosa. Su conclusión fue que utilizando glicerol más trehalosa o sacarosa, constituye una buena alternativa para la criopreservación de semen ovino.

3. JUSTIFICACIÓN

La postergación de la maternidad y paternidad es un fenómeno que se presenta cada vez con mayor frecuencia en el mundo. En América Latina, más del 50% de los países tienen tasas de fecundidad global (TGF) por debajo del nivel de reemplazo (2.1 hijos por mujer). Esto se correlaciona con la postergación de la maternidad en favor del desarrollo profesional y personal (Fuentes *et al.* 2021).

Las generaciones actuales enfrentan factores socioeconómicos que han transformado la dinámica reproductiva, promoviendo una búsqueda más temprana de desarrollo laboral y profesional. Este fenómeno ha contribuido a un retraso en la maternidad y paternidad, lo que genera un impacto significativo en la fertilidad y en los resultados reproductivos. Entre las mujeres, el envejecimiento ovárico reduce la calidad y cantidad de óvulos disponibles, mientras que, en los hombres, la calidad del semen disminuye con la edad avanzada, acompañado de mayores tasas de mutaciones genéticas en los espermatozoides (Buwe et al., 2005).

Además, las técnicas de reproducción asistida (TRA) han emergido como herramientas cruciales para superar estos desafíos. Estas técnicas no solo permiten planificar y retrasar el primer embarazo, sino que también ofrecen soluciones frente a las dificultades de concepción relacionadas con la edad y otros factores de salud reproductiva. Estudios recientes destacan la importancia de la criopreservación de

gametos como estrategia para preservar la fertilidad en mujeres y hombres jóvenes que desean postergar su vida reproductiva (Jordana & Herrera, 1974).

Por ello es importante contemplar las técnicas de reproducción asistida, como la criopreservación de espermatozoides que es una herramienta que permite optimizar los tratamientos de esterilidad y preservar la fertilidad en pacientes que, potencialmente, pueden perderla por diversos tratamientos o para pacientes que por alguna razón postergan su paternidad, esta técnica sería de mucha utilidad ya que cuando decidieran concebir un hijo, contaría con sus gametos en buen estado morfológico y fisiológico.

Las técnicas de reproducción asistida, como la criopreservación de espermatozoides, ofrecen soluciones prometedoras para la conservación de especies en peligro de extinción. Las poblaciones pequeñas y aisladas de estas especies, con un bajo flujo génico y frecuentes cruces entre individuos emparentados, a menudo enfrentan la consanguinidad, lo que aumenta la vulnerabilidad a enfermedades, parásitos y problemas reproductivos (Frankham 1995). La criopreservación de esperma puede jugar un papel crucial en la conservación de especies amenazadas, al permitir la creación de bancos de esperma que proporcionan una reserva genética con potencial ilimitado (Sharafi *et al* 2022)

Debido a lo ya expuesto, es importante estudiar si los espermatozoides de ratón (*Mus musculus*) se pueden preservar por vitrificación rápida y ultrarrápida usando un crioprotector a base de sacarosa y EG, que les permita conservar su movilidad, viabilidad e integridad de la membrana después de la vitrificación. Este estudio también nos podría proporcionar una alternativa en el uso del crioprotector para la preservación de espermatozoides humanos por vitrificación, que posteriormente puedan ser utilizados en las TRA.

En el presente trabajo se determinó la fragmentación del ADN de espermatozoides de ratones la cepa CD-1 previamente criopreservados usando dos métodos de vitrificación (rápida y ultrarrápida) y se comprobó si conservan la capacidad fertilizante para ser utilizados en las TRA.

4. HIPÓTESIS

El uso de un crioprotector a base de sacarosa y etilenglicol para la vitrificación de espermatozoides de ratón de la Cepa CD-1 mantiene la integridad del ADN de las células y su capacidad fertilizante.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar si la vitrificación rápida o ultrarrápida al usar sacarosa y etilenglicol como crioprotectores mantienen la capacidad fertilizante y la integridad de ADN de los espermatozoides de ratones de la cepa CD-1.

5.2. Objetivos Particulares

- Evaluar si el método de vitrificación rápida y el uso de un crioprotector a base de sacarosa y etilenglicol mantienen la viabilidad y movilidad de los espermatozoides de ratones de la cepa CD-1.
- Evaluar si el método de vitrificación ultrarrápida y el uso de un crioprotector a base de sacarosa y etilenglicol mantienen la viabilidad y movilidad de los espermatozoides de ratones de la cepa CD-1.
- Evaluar si los métodos de vitrificación rápida y ultrarrápida mantienen integridad del ADN espermático de ratones de la cepa CD-1 (prueba cometa).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP.

El diseño experimental se realizó en cuatro fases, que se ilustran en el siguiente esquema de trabajo:



Se utilizaron un total de 20 ratones, macho, de 10 semanas de edad, de la cepa CD-1. Para la criopreservación de los espermatozoides se realizaron 10 experimentos en grupos de dos ratones cada uno, Se obtuvieron los espermatozoides y se dividieron en tres grupos: a). Control (sin vitrificar) b). Vitrificación rápida, c). Vitrificación ultrarrápida.

Todos los animales de Laboratorio fueron proporcionados por el Bioterio Claude Bernard de la BUAP. Todos los experimentos se ajustaron a la NOM-062-ZOO-1999 que trata sobre las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

7.1 Obtención de espermatozoides

En cada experimento, los animales se sacrificaron mediante la cámara de CO₂. La obtención de espermatozoides se realizó en condiciones estériles. En una cama de disección se realizó un corte sagital en la parte anterior de la cavidad abdominal para obtener los testículos y separar de ellos los epidídimos. Estos se colocaron en una caja Petri con medio CZB a una temperatura de 37°C y por el conducto deferente se procedió a inyectar 1 ml de medio CZB para que, al realizar una incisión por la cola del epidídimo se obtuvieran los espermatozoides.

6. 2 Seminograma

Una vez obtenidos los epidídimos, los espermatozoides fueron recuperados en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Las células se mantuvieron en baño María a 37°C (Figura 4), para mantener la temperatura fisiológica de las células.



Figura 4. Incubación de espermatozoides. Los espermatozoides obtenidos se mantuvieron en Baño María a 37°C para mantener su temperatura fisiológica.

Posteriormente se determinó la viabilidad y movilidad de los espermatozoides mediante un seminograma. Aquellas muestras que presentaban menos del 50% de movilidad fueron descartadas. El análisis microscópico del semen (que forma parte del seminograma) comprende la evaluación de siete parámetros: movilidad,

vitalidad, concentración, morfología, aglutinación y agregación inespecífica y otros tipos celulares.

6. 2.1 Movilidad

Una vez homogeneizada la muestra con ayuda de una micropipeta, se tomó una muestra de 10 μ L y se colocó sobre un portaobjetos de 25 x 75 mm y se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. Esto produjo la distribución uniforme de la muestra en la superficie del portaobjetos, que después se observó a 40x en un microscopio óptico (Nikon TS 100). Se realizó un conteo de la movilidad de 200 espermatozoides en diferentes campos, siguiendo la dirección de las manecillas del reloj.

La movilidad espermática se clasificó en porcentaje (%) con base en las siguientes categorías: a) **Movilidad progresiva**: que es cuando el espermatozoide se desplaza en una sola dirección; b) **Movilidad *in situ* o no progresiva**: expresada por el movimiento de la célula, pero sin desplazamiento y c) **Inmóviles**: cuando el espermatozoide no tiene ningún tipo de movilidad. También se calculó la **movilidad total** de la muestra, mediante la fórmula $MT = A + B$, Donde MT es la movilidad total, A es la movilidad progresiva y B movilidad no progresiva.

6.2.2 Viabilidad

El porcentaje de células viables debe ser superior al de las células móviles. Para evaluarlo, una vez homogeneizada la muestra con la micropipeta, se colocó 5 μ l de colorante (eosina-nigrosina al 5%) en el portaobjetos y 5 μ l de la muestra espermática (Figura 6), homogeneizando con ayuda de la punta de la micropipeta y se cubrió con el cubreobjetos, dejándola estabilizar durante 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se observó en un microscopio óptico con el objetivo de 40x y

se contaron 200 espermatozoides en diferentes campos, siguiendo la dirección de las manecillas del reloj.

La clasificación de las células se hizo de la siguiente manera: **Vivos:** Espermatozoides no teñidos, o **Muertos:** Espermatozoides teñidos con eosina nigrosina (Fig. 5).

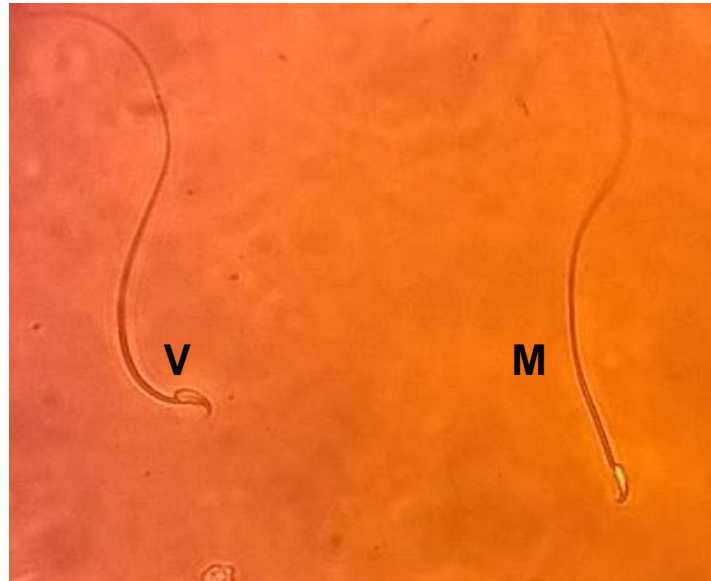


Figura 5. Evaluación de la viabilidad de espermatozoides teñidos con colorante eosina nigrosina. Se realizó el análisis de muestras de espermatozoides para determinar su viabilidad. Se observaron espermatozoides vivos (V, sin teñir) y espermatozoides muertos (M, teñidos).

6. 2.3 Concentración

Para determinar la concentración de células de la muestra, se realizó una dilución de acuerdo a la cantidad de células existentes en el semen con la solución inmovilizadora para espermatozoides (NaHCO_3 al 2.9% y formaldehído al 1%). De esta muestra se tomaron 10 μl y se colocó en la cámara de Neubauer (Figura 6). La concentración de espermatozoides se expresó en millones de células/mL. Para la obtención de este valor se utilizó el promedio del conteo de dos cámaras del hemocitometro y se multiplicó por el factor de la dilución y el del volumen de la cámara (10,000).

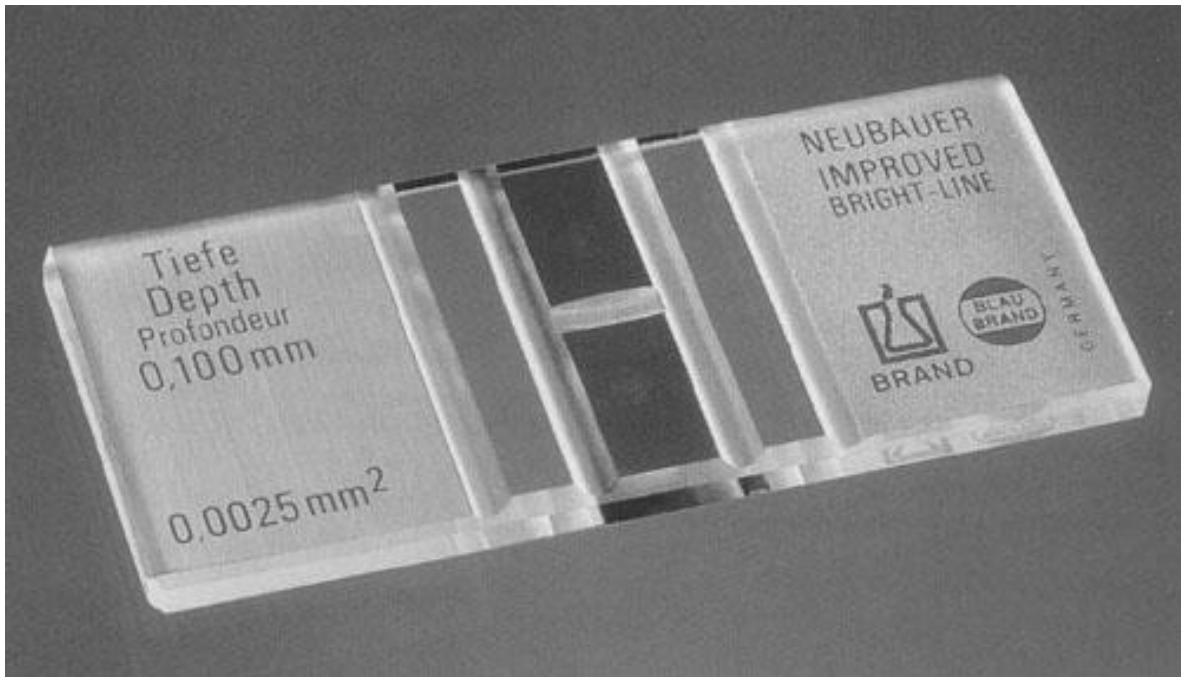


Figura 6. Cámara de Neubauer. La cámara Neubauer es utilizada para realizar el conteo espermático.

6.3 Criopreservación

La criopreservación de los espermatozoides se llevó a cabo por 2 métodos de vitrificación: la rápida y la ultrarrápida. Para cada método de la criopreservación se utilizó una solución con dos 2 crioprotectores (permeable y no permeable):

- Crioprotector no penetrante: sacarosa 0.7 M, disuelto en medio CZB
- Crioprotector penetrante: etilenglicol 1.3 M, disuelto en medio CZB.

Consúltese la sección de anexos para conocer cómo preparar el medio CZB.

6.3.1 Selección de espermatozoides por *Swim-up*

Una vez determinada la concentración de células de la muestra se colocó una concentración 10×10^6 células en un tubo cónico y se le agregó 500 μ l de medio CZB,

esto fue centrifugado a 500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue eliminado y al botón celular en el tubo Eppendoff, se le adicionó 500 µl de medio con albúmina al 4%, se incubó por 45 minutos a 37°C con una inclinación de 45°. Posteriormente, las células presentes en el medio de la parte superior del tubo se separaron de las células del botón y se mezclaron en una proporción 1:2 con el crioprotector a base de Etilenglicol-Sacarosa.

6.3.2 Vitrificación Rápida

En un recipiente de unicel que contenía Nitrógeno líquido se le colocó una gradilla y encima un portaobjetos (Figura 7) donde se procedió a realizar perlas con la mezcla de los espermatozoides y el crioprotector (1:2). Para ello, se depositaron gotas de 100 µL de la mezcla en el portaobjetos y las perlas que se formaron por la solidificación (Figura 8) fueron recolectadas en un criovial previamente etiquetado con la fecha y datos, se almacenaron en un tanque de Nitrógeno Líquido por al menos 2 semanas.



Figura 7. Vitrificación rápida. Imágenes que muestran la técnica de vitrificación rápida por medio de la formación de perlas en vapores de nitrógeno líquido y su almacenamiento en crioviales dentro de un tanque de Nitrógeno Líquido.



Figura 8. Perlas formadas por vitrificación rápida. Se depositaron gotas de 100 μ L de la mezcla de los espermatozoides y el crioprotector en un portaobjetos para la creación de perlas.

6.3.3 Vitrificación Ultrarrápida

En este caso, se mezclaron 100 μ L de Crioprotector y 100 μ L de la suspensión de espermatozoides (10×10^6 células). En un recipiente de unicel que contenía Nitrógeno líquido se procedió a realizar perlas con la mezcla de los espermatozoides y el crioprotector, para ello se dejó gotear la mezcla directamente sobre el Nitrógeno y las perlas que se formaron (Figura 9) fueron recolectadas en un criovial y almacenadas en un tanque de Nitrógeno Líquido por al menos 2 semanas. Es importante que el material que entre en contacto directo con las perlas (viales y pinzas) se atemperen y estén en contacto directo con el nitrógeno líquido o sus vapores para evitar que las perlas se derritan y con ello exista una falla en la metodología.



Figura 9. Perlas formadas por vitrificación ultrarrápida. Se depositaron gotas de la mezcla de los espermatozoides y el crioprotector directamente al nitrógeno líquido.

6.4 Desvitrificación

A las dos o más semanas de almacenaje de las muestras de espermatozoides almacenados en Nitrógeno Líquido se procedió a desvitrificarlos. Para ello, se retiraron del tanque de nitrógeno, las perlas de cada una de las muestras se depositaron en un tubo de Eppendorf con 500 μ L de medio CZB y se colocaron en baño María a 37° por 5 minutos (Figura 10). Se procedió a analizar la viabilidad, movilidad de las células y posteriormente se realizó el ensayo cometa.



Figura 10. La desvitrificación de las muestras de espermatozoides se realizó al incubar las perlas con el medio CZB en Baño María a 37° por 5 minutos.

6.5 Ensayo Cometa

El ensayo Cometa es una técnica que permite evaluar el daño y la reparación del ADN en células individuales. Su fundamento radica en la electroforesis de células embebidas en agarosa, que separa fragmentos de ADN dañados formando una "cola de cometa". Es ampliamente utilizado en estudios de genotoxicidad, ecotoxicología y biomonitorización ambiental y ocupacional. Además, es útil por su sensibilidad, bajo costo y aplicabilidad en células proliferativas y no proliferativas. (Rodríguez *et al.* 2016).

Esta técnica se aplicó a las muestras de semen antes y después del proceso de vitrificación, para determinar si el grado de fragmentación del ADN de las muestras se modificaba por efecto de la criopreservación.

Se prepararon geles de dos diferentes concentraciones: Gel al 4% de agarosa a punto de fusión normal en solución de TAE y Gel al 3% de agarosa a punto de fusión normal en solución de TAE (Figura 11).



Figura 11. Geles de agarosa. Los geles de agarosa al 3% y 4% son utilizados para la elaboración de los geles para la prueba COMETA.

6.5.1 Preparación de la muestra para la electroforesis.

En los portaobjetos se colocaron 200 μL de gel de agarosa al 4% y se cubrieron inmediatamente con el cubreobjetos de 22 x 40 mm. Una vez solidificado el gel se retiró el cubreobjetos. Posteriormente se mezcló 350 μL de la muestra de espermatozoides por cada 125 μL de gel de agarosa al 3% y de esta solución se colocaron 200 μL sobre el gel solidificado al 4%. Se colocó un cubreobjetos de 22 x 40 mm y se esperó a que solidificara. Todo el procedimiento se realizó sobre una superficie fría.

Lisis de proteínas

En una caja Petri los geles se cubrieron con buffer de lisis que contiene detergentes y agentes que degradan lípidos y proteínas, como Triton X-100, EDTA, y Tris-HCl, permitiendo desnaturalizar el ADN y preparar las células para la electroforesis (Rodríguez *et al.* 2016). Se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Se cuidó que el buffer no se evaporara para que las muestras no se deshidrataran.

Electroforesis

Se colocaron los portaobjetos en la cámara de electroforesis y se sumergieron en TAE, se tapó la cámara y se programó con una corriente de 50 V y 300 mA por 20 minutos (Figura 12), después de la corrida los geles se lavaron con Tris al 0.5%.

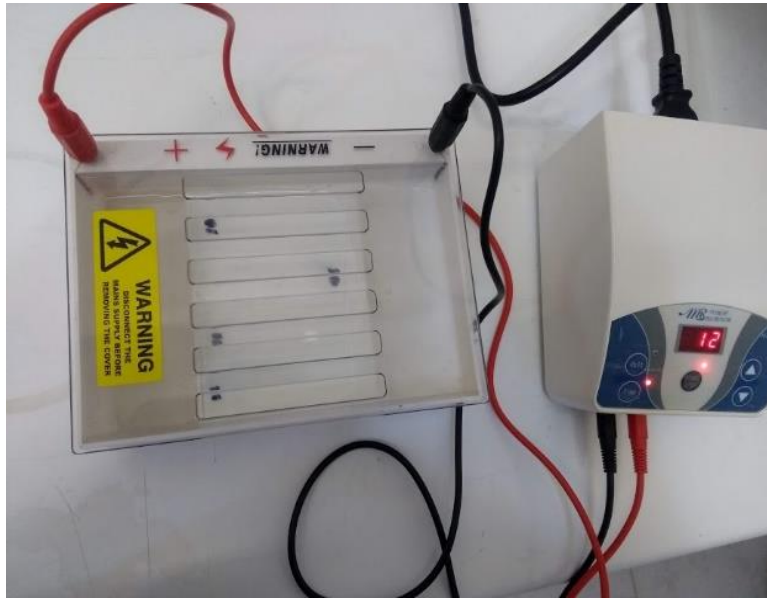


Figura 12. Cámara de electroforesis. La cámara de electroforesis fue utilizada para el corrimiento de geles a 50 V y 300 mA por 20 min.

Tinción

Para teñir los espermatozoides en los geles se utilizaron 150 μ L de Anaranjado de Acridina al 1% diluido 1:100 con agua destilada y se incubaron por 15 min protegidos de la luz, se lavaron con PBS 3 veces y se colocaron cubreobjetos de 24 x 50 mm. Se guardaron las preparaciones protegidas de la luz.

Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio de Fluorescencia (Figura 13) a una longitud de onda de 526 nm y se determinó el grado de fragmentación del ADN de la muestra por la presencia de células que se desplazaron dentro del gel dejando tras de sí una estela de material fragmentado (un cometa), esto mediante la cuantificación en porcentaje de células con cometa y células sin cometa.

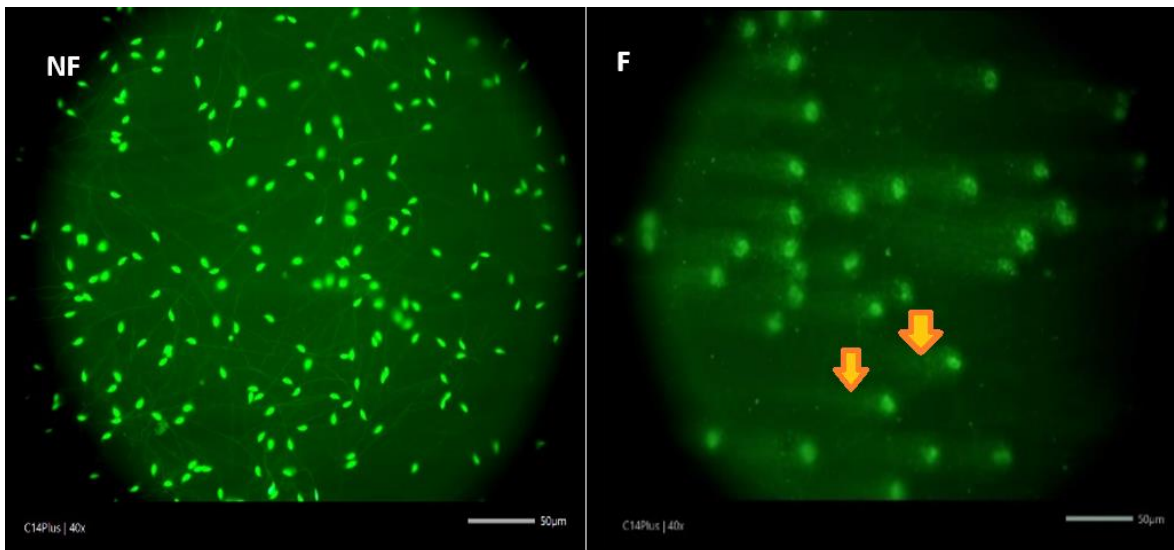


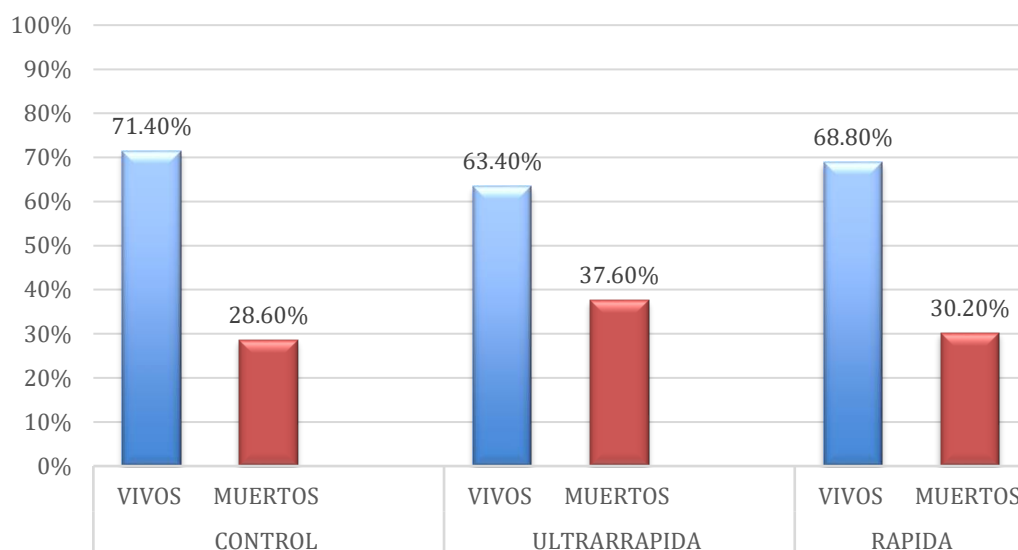
Figura 13. Evaluación de la fragmentación de ADN espermático con la prueba COMETA. Podemos observar células no fragmentadas (NF) y células fragmentadas (F). Las flechas anaranjadas señalizan la cola que dejan los fragmentos de ADN durante el corrimiento.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad espermática.

La criopreservación de los espermatozoides por vitrificación rápida o ultrarrápida al utilizar etilenglicol y sacarosa como crioprotector no daña la membrana de las células después de la desvitrificación, por lo que no compromete su viabilidad. Los valores obtenidos no presentan diferencias significativas con respecto al grupo control (Gráfica 1). En el grupo control se obtuvo: 71.40% de espermatozoides vivos y 28.60% de espermatozoides muertos, en el grupo con vitrificación ultrarrápida 63.40% vivos y 37.60% muertos y en el grupo con vitrificación rápida el 68.80% de las células estaban vivas y 30.20% muertas.

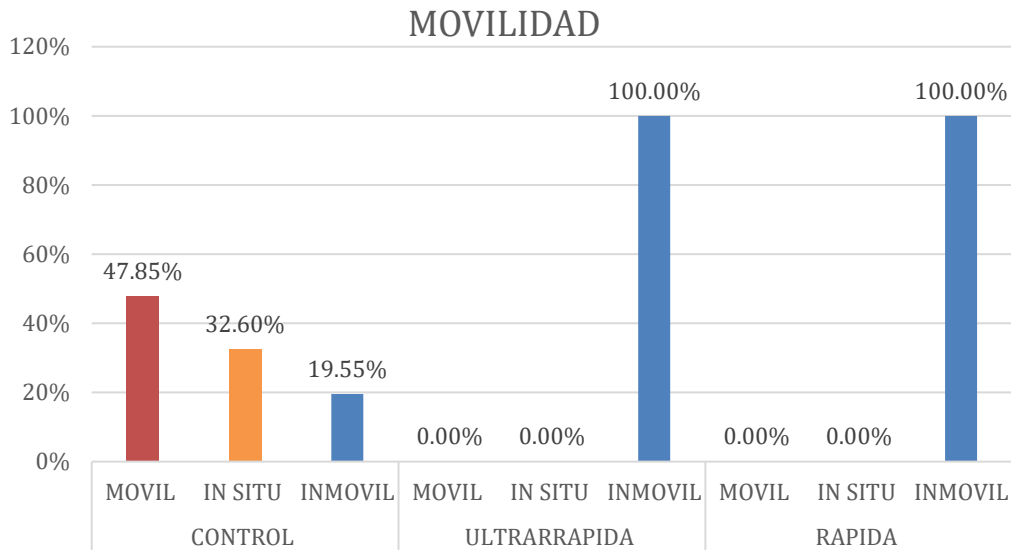
VIABILIDAD



Gráfica 1. La viabilidad espermática no es afectada por la vitrificación. Se comparan los resultados de viabilidad en los diferentes tipos de vitrificación utilizados (Ultrarrápida y Rápida).

7.2 Efecto de la vitrificación sobre la movilidad espermática.

Al determinar la movilidad de los espermatozoides después de desvitrificar las células almacenadas en nitrógeno líquido con los crioprotectores etilenglicol y sacarosa, en ningún experimento se logró recuperarla en ninguno de los dos procedimientos utilizados (Gráfica 2), ya que la movilidad de los espermatozoides disminuye drásticamente a cero con la vitrificación rápida (-96°C) y ultrarrápida (-196°), con los crioprotectores utilizados en comparación al control.



Gráfica 2. La movilidad espermática se pierde a causa de la vitrificación. Gráfica comparativa del resultado obtenido en la movilidad de los diferentes tipos de vitrificación con los crioprotectores etilenglicol y sacarosa. Nótese que para ambos procedimientos todas las células perdieron su movilidad después de haber sido criopreservadas, a pesar de haberse usado una mezcla de crioprotectores.

7.3 Efecto de la criopreservación sobre la integridad del ADN del espermatozoide

La integridad del ADN espermático no se ve afectada por el proceso de criopreservación con ninguno de los métodos, ya que los resultados de la prueba cometa no arrojaron diferencias con respecto al grupo control (Figura 14).

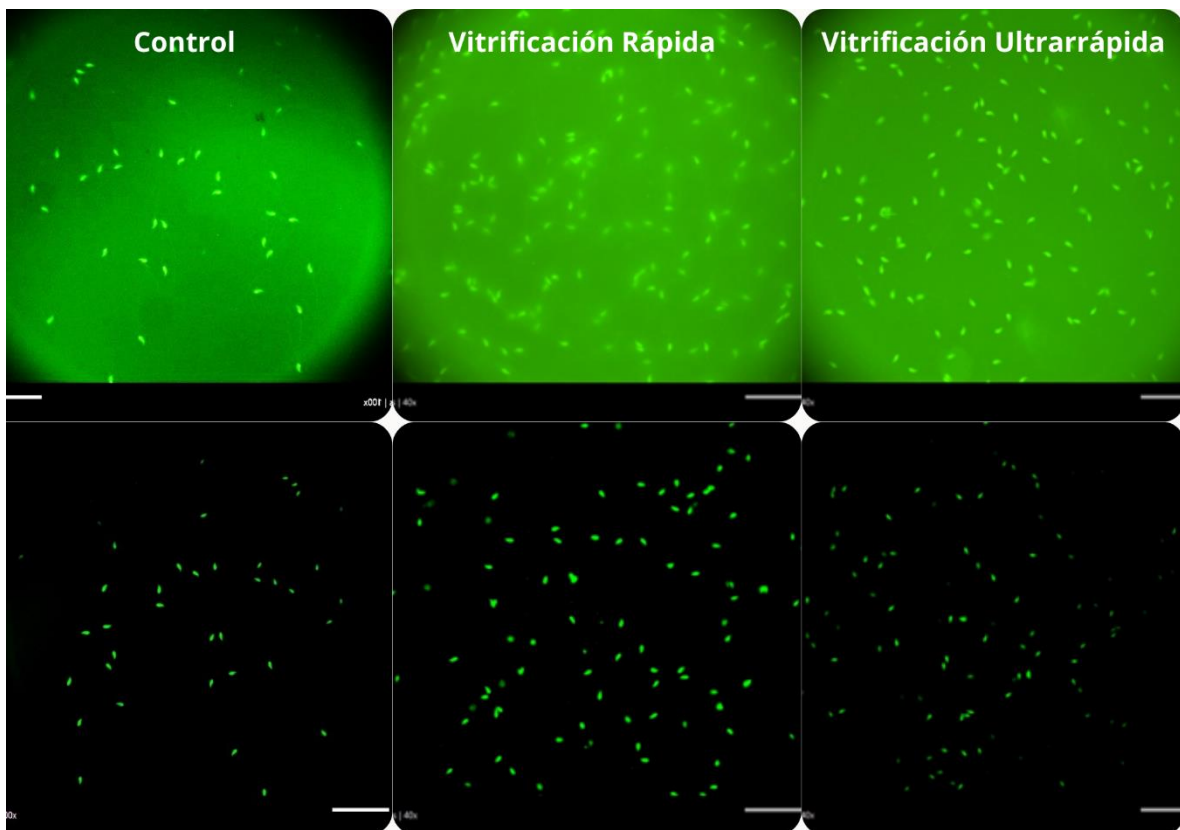


Figura 14. La vitrificación no incrementa la fragmentación del ADN. Se muestra que el ADN espermático no se ve afectado por la desvitrificación tanto Rápida (fotografías de la columna de en medio) como Ultrarrápida (columna derecha) respecto al grupo control (fotografías de la columna izquierda). Teniendo un 0% de fragmentación de ADN espermático,

8. DISCUSIÓN

La criopreservación de espermatozoides ha abierto nuevas posibilidades en el ámbito de la biología reproductiva, especialmente en técnicas de reproducción asistida y la conservación de especies en peligro de extinción. Aunque la congelación lenta ha sido el método estándar durante años, la vitrificación ha ganado popularidad como una alternativa eficaz para minimizar el daño celular, principalmente la formación de cristales de hielo que pueden comprometer la integridad de los espermatozoides.

Uno de los avances recientes más significativos en esta técnica ha sido el uso de crioprotectores como el etilenglicol y la sacarosa. Estos agentes juegan un papel crucial en la preservación de la viabilidad celular y la integridad del ADN espermático durante el proceso de vitrificación. Este estudio se centró en evaluar el impacto de una mezcla de estos crioprotectores, al utilizar como técnica de criopreservación de espermatozoides de ratón de la cepa CD-1, la vitrificación rápida y ultrarrápida. Los resultados mostraron beneficios claros, aunque también se observaron algunas limitaciones que merecen una atención más detallada.

8.1 Efectividad del etilenglicol como crioprotector intracelular

El etilenglicol se destacó en este estudio por su capacidad para proteger a las células espermáticas de ratón durante el proceso de vitrificación. Su capacidad para penetrar rápidamente las membranas celulares lo hace ideal para proteger el ADN, así como estructuras internas críticas. En comparación con otros crioprotectores como el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol es menos tóxico, lo que sugiere que es una opción más segura para preservar la viabilidad de los espermatozoides. (Zurita Burmester, D. 2019)

Los experimentos realizados indicaron que el etilenglicol permitió obtener tasas más altas de viabilidad celular, lo que es esencial para mantener el potencial de fertilización después de la descongelación. Sin embargo, ajustar su concentración es un desafío importante. Concentraciones demasiado bajas pueden no ofrecer suficiente protección, mientras que concentraciones excesivas pueden provocar daños osmóticos, comprometiendo la integridad celular.

8.2 Sacarosa como estabilizante osmótico

Por otro lado, la sacarosa demostró ser eficaz para reducir el daño osmótico que se presenta durante la vitrificación. Actúa principalmente como un crioprotector

extracelular, evitando el colapso celular al extraer el agua intracelular antes de la congelación. Este proceso reduce la formación de cristales de hielo en el interior celular y protege la membrana celular. Los resultados obtenidos en este estudio apoyan investigaciones previas (Agca *et al* 2000 & Mazur *et al* 2008) que sugieren que la adición de sacarosa mejora la supervivencia de los espermatozoides de ratón de la cepa CD-1, reduciendo el daño causado por el frío.

No obstante, al igual que ocurre con el etilenglicol, la concentración de la sacarosa debe ser cuidadosamente ajustada. Una concentración demasiado baja podría ser insuficiente para proteger a la célula, mientras que una cantidad excesiva podría causar deshidratación extrema, afectando la viabilidad después de la descongelación.

8.3 Beneficios y limitaciones de la vitrificación rápida y ultrarrápida

En este estudio, la vitrificación rápida y ultrarrápida apoyada con el uso de una mezcla de etilenglicol:sacarosa fue especialmente relevante en el contexto de la reproducción asistida, donde la integridad del ADN y la viabilidad celular son cruciales para el éxito de la fertilización y el desarrollo embrionario. En este caso, las células criopreservadas por cualquiera de los dos métodos pueden ser utilizadas en la técnica de microinyección intracitoplásmica (ICS) debido a que preservan la viabilidad e integridad del ADN espermático.

Sin embargo, la vitrificación rápida no está exenta de desafíos. Aunque se minimiza la formación de cristales de hielo, el riesgo de choque térmico sigue siendo una preocupación significativa (Zhao *et al.*, 2014). Además, esta técnica requiere equipos especializados y habilidades técnicas avanzadas, lo que puede limitar su aplicación en laboratorios o clínicas con recursos limitados para la criopreservación de espermatozoides de diferentes especies de mamíferos, incluidos los humanos (Mazur, 1984).

Uno de los principales desafíos observados es la pérdida de la movilidad espermática tras la vitrificación. Este fenómeno podría deberse a múltiples factores, como el alto grado de compactación de la cromatina en los espermatozoides, que reduce la flexibilidad nuclear y limita la recuperación funcional. Asimismo, el uso de crioprotectores penetrantes podría dañar las mitocondrias, esenciales para la producción de ATP, afectando la energía requerida para el movimiento espermático (Barrios et al., 2019; Isachenko et al., 2004). Además, el estrés osmótico y el impacto en las membranas celulares durante el proceso de congelación y descongelación pueden comprometer la funcionalidad del axonema (Berrios & Sánchez, 2011). Cabe destacar que, en el caso de los espermatozoides de ratón de la cepa CD-1, no existen reportes previos sobre la recuperación de la motilidad tras la vitrificación, lo cual coincide completamente con nuestros hallazgos.

Para abordar esta problemática, algunos estudios han explorado soluciones estimulantes post-desvitrificación, como la cafeína o la pentoxifilina, que pueden mejorar temporalmente la actividad mitocondrial y el transporte de calcio intracelular, promoviendo la motilidad (Berrios & Sánchez, 2011; Zhao et al., 2014). Asimismo, ajustes en los protocolos de criopreservación, como el uso de combinaciones de crioprotectores de baja toxicidad junto con sacarosa, han demostrado potencial para reducir el daño osmótico y mejorar la viabilidad celular (Isachenko et al., 2004; Mazur, 1984). Estos avances subrayan la importancia de continuar optimizando las técnicas de vitrificación, especialmente en modelos experimentales como *Mus musculus*, para mejorar su aplicabilidad en reproducción asistida y conservación genética.

9. CONCLUSIÓN

En resumen, el uso de etilenglicol y sacarosa como crioprotectores en la vitrificación rápida y ultrarrápida ofrece una alternativa prometedora para mejorar la viabilidad y la integridad del ADN espermático después de la criopreservación. Sin embargo, el

éxito de esta técnica depende de la optimización precisa de las concentraciones de estos agentes y de un control riguroso de las condiciones de enfriamiento y descongelación. Futuros estudios deberían centrarse en ajustar las concentraciones de crioprotectores y Determinar la eficacia de agentes bioquímicos en la mejora de la motilidad espermática, para optimizar su aplicabilidad en técnicas de reproducción asistida, tanto en humanos como en animales.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agca, Y., Liu, J., Peter, A. T., Critser, E. S., & Critser, J. K. (2000). Fundamental cryobiology of spermatogonial stem cells: A review. *Molecular Reproduction and Development*, *57*(3), 252–259.
2. Aoki, V. W., Liu, L., & Carrell, D. T. (2005). Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Human Reproduction*, *20*(5), 1298–1306.
3. Barríos, J. M., & González, J. M. (2019). Mitochondrial dynamics and the regulation of sperm motility. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*, 214.
4. Berrios, S. O., & Sánchez, G. R. (2011). 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.
5. Boiso, I. (2001). Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, *4*, 1–18.
6. Buwe, A., Guttenbach, M., & Schmid, M. (2005). Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenetic and Genome Research*, *111*(3-4), 213–228.
7. Calull, B. A., González, O. C., Cancino, V. P., Zúñiga, S. P., Ruvalcaba, O. L., & Gutiérrez, G. A. M. (2017). Alteración de los parámetros seminales y su

- asociación con la fragmentación del ADN espermático. *Ginecología y Obstetricia de México*, 85(7), 409–420.
8. Critser, K. J., Agca, Y., & Gunasena, T. K. (1997). The cryobiology of mammalian oocytes. In *Reproductive Tissue Banking* (pp. 329–357). Academic Press.
 9. Dadoune, J. P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique*, 1, 56–75.
 10. De Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 13, 1–8.
 11. De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32–44.
 12. Derijck, A., Van der Heijden, G., Giele, M., Philippens, M., & de Boer, P. (2008). DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes: The first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Human Molecular Genetics*, 17(14), 1922–1937.
 13. Dochi, O., & Takakura, K. H. (1990). Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 36, 69–72.
 14. Evenson, D. P. (2016). The sperm chromatin structure assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 56–75.
 15. Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research*, 339(1), 37–59.
 16. Frankham, R. (1995). Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29, 305–327.
 17. Fuentes, A., Sequeira, K., & Tapia-Pizarro, A. (2021). Efectos demográficos, clínicos y biológicos de la postergación de la maternidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(2), 146–160.

18. Fuller, B., & Paynter, S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(6), 680–691.
19. García, J., & Vila, L. (1984). Criopreservadores: concepto y manejo. *Biología Clínica Hematología*, 6, 219–225.
20. Gilbert, F. (2006). *Biología del desarrollo* (7th ed.). Editorial Médica Panamericana.
21. Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., & Tesarik, J. (2005). Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *Journal of Andrology*, 26(3), 349–353.
22. Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., & Aitken, R. J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *Journal of Andrology*, 21(1), 33–44.
23. Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I. I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F., & Van Der Ven, H. (2004). Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: Effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1167–1173.
24. Jordana, R., & Herrera, L. (1974). Reproducción sexual en animales. *Persona y Derecho*, 1, 409-434.
25. Lamotte, M., & Pro L'Héritier. (1975). *Biología general*. Alhambra.
26. Medeiros, A. S. L., Gomes, G. M., Carmo, M. T., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 58(2), 273–276.
27. Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), 125–142.
28. Mazur, P., Leibo, S. P., & Seidel, G. E. (2008). Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and biomedical research: Importance, impact, status, and future directions. *Biology of Reproduction*, 78(2), 2–12.

29. Martino, A., Songsasen, N., & Leibo, S. P. (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction*, 54(5), 1059–1069.
30. Nelson, G. E., Robinson, G. G., & Boolootian, R. A. (1973). *Conceptos fundamentales de biología*. Limusa.
31. Oliva, R., & Dixon, G. H. (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 40, 25–94.
32. Portella, R. J. R., & Gonzales, G. F. (2016). Fragmentación del ADN espermático: Origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecología y Obstetricia de México*, 84(7), 462–473.
33. Quintero, V. G. A., Bermúdez, C. R. M., & Castillo, C. J. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: Un problema actual. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), 144–151.
34. Rall, W. F., & Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573–575.
35. Rodríguez-Rey, Alexis, Noris-García, Elena, & Fundora Torres, María Teresa. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(2), 184-194.
36. Sandoval, M. R., Santiani, A. A., Ruiz, G. L., Leyva, V. V., Coronado, S. L., & Delgado, C. A. (2007). Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 18(2), 107–114.
37. Saha, S., Otoi, T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C., & Suzuki, T. (1996). Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*, 33(3), 291–299.
38. Salomon, S., & Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 77–111.

39. Shaw, J. M., Oranratnachai, A., & Trounson, A. O. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, *53*(1), 59–72.
40. Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., & Benson, J. D. (2022). Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, *12*(23), 3271
41. Singh, N. P., Danner, D. B., Tice, R. R., McCoy, M. T., Collins, G. D., & Schneider, E. L. (1989). Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Experimental Cell Research*, *184*(2), 461–470.
42. Sommerfeld, V., & Niemann, H. (1999). Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, *38*(2), 95–105.
43. Temboursy, M. M. C. (2009). Desarrollo puberal normal: Pubertad precoz. *Pediatría Atención Primaria*, *11*(Supl. 16), 127–142.
44. Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, *60-61*, 357–364.
45. Velez de la Calle, J. F., Muller, A., Walschaerts, M., Clavere, J. L., Jimenez, C., Wittemer, C., & Thonneau, P. (2008). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: Results of a large prospective multicenter study. *Fertility and Sterility*, *90*(5), 1792–1799.
46. Zeron, Y., Tomczak, J. M., & Crowe, A. A. (2000). Electrofusion of bovine oocytes with different liposomes changes the membrane thermobehavior and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology*, *53*(2), 267.
47. Zhao, G., Takamatsu, H., & He, X. (2014). The effect of solution nonideality on modeling transmembrane water transport and diffusion-limited intracellular ice formation during cryopreservation. *Cryobiology*, *115*(14).

48. Zurita Burmester, D. (2019). *Comparación de crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides de alpaca* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional UNALM.

11. ANEXO

Medio CZB (Chatot, Ziomek, Bavister)

Compuesto	Concentración mM
Hepes	20.0 mM
NaCl	81.6 mM
KCl	4.8 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 mM
CaCl ₂	1.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
EDTA. Na ₂	0.1 mM
Na Lactato	31.0 mM
NaHCO ₃	5.0 mM
Na Piruvato	0.3 mM
Rojo Fenol	10 ug/ml (0.02%) en Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPSB)
BSA	1mg/ml

- **Preparación:**

1. Disolver los componentes en agua destilada estéril, ajustando el pH a 7.4.

2. Filtrar la solución usando un filtro de 0.22 μm .
3. Almacenar a 4°C hasta su uso.

Solución de Crioprotección

Compuesto	Concentración M
Etilenglicol (EG)	1.3 M
Sacarosa	0.7 M
Medio CZB	

1. Preparación:

1. Mezclar 650 μL de etilenglicol con 350 μL de medio CZB.
2. Añadir 0.7 M de sacarosa a la solución.
3. Filtrar y ajustar el pH a 7.2.
4. Almacenar a 4°C.

Solución de Eosina-Nigrosina para Viabilidad

• Componentes:

- Eosina Y: 5%
- Nigrosina: 5%
- Solución salina (NaCl 0.9%): c.s.p.}

• Preparación:

1. Disolver 5 g de eosina y 5 g de nigrosina en 100 mL de solución salina al 0.9%.

2. Filtrar la solución y almacenar en frasco oscuro para proteger de la luz.
3. Usar a temperatura ambiente.

Solución TAE 10X 1L

Compuesto	Concentración mM
Tris	40 Mm
Ácido acético	20 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM

- **Preparación:**

1. Disolver 48.5 g de Tris base en 1 L de agua destilada.
2. Añadir 11.4 mL de ácido acético y 3.72 g de EDTA.
3. Ajustar el pH a 8.0 si es necesario.
4. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de Buffer de Lisis

Compuesto	Concentración
NaCl	2.5 M
EDTA	100 mM
Tris-HCl	10 mM
DMSO	10%

DTT	10 M
Tritón	1%

- **Preparación:**

1. Disolver 146.1 g de NaCl, 18.6 g de EDTA, y 1.21 g de Tris en 1 L de agua destilada.
2. Añadir 10 mL de Tritón X-100 y 100 mL de DMSO.
3. Ajustar el pH a 10 y almacenar a 4°C.

