



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biología

Estudio de la fragmentación del ADN espermático mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel a pH alcalino y pH neutro de muestras de donadores de banco de semen criopreservadas por congelación convencional y rápida

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTAN

Miriam Nava Muciño

Alberto Ezequiel Calderón Ponce

DIRECTOR

M. en C. PEDRO CUAPIO PADILLA

HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español

ASESOR

Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Ciudad de México

Mayo, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente:	Dra. Patricia Rosas Saucedo
Vocal:	M. en C. Pedro Cuapio Padilla
Secretario:	Dr. Juan José Rodríguez Mercado
1er. Suplente:	M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez
2do. Suplente:	Dra. Elia Roldán Reyes

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del M. en C. Pedro Cuapio Padilla de HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida del Hospital Español cuyo Director es el Dr. Carlos Salazar López Ortiz. Y con el asesoramiento del Dr. Juan José Rodríguez Mercado de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) cuyo Director es el Dr. Mario Agustín Altamirano; laboratorio L-5 PA de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental (UMIEZ) de la FES-Zaragoza, Campus II, UNAM.

Durante el desarrollo de ésta investigación se recibió apoyo de **UNAM-DGAPA-PAPIIT**, proyecto **IN-225216** y de **Hisparep**, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español.

AGRADECIMIENTOS

*A nuestro director de tesis y amigo **Pedro Cuapio Padilla** por guiarnos y confiar en nosotros siempre, compartir sus historias y hacer ameno este trabajo, es un gran ejemplo a seguir. Siempre adelante...*

*A la **Dra. Patricia Rosas Saucedo** con una especial dedicación, por regalarnos tardes de plática y agradables historias, por guiarnos en todos los aspectos desde el inicio y compartirnos su sabiduría y cariño.*

*Al **Dr. Juan José Rodríguez Mercado** por abrirnos las puertas del laboratorio y recibirnos siempre con la mejor actitud para trabajar. Por brindarnos toda su experiencia y estar pendiente en todas las etapas de este trabajo.*

*A la **M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez** y la **Dra. Elia Roldán Reyes** por su apoyo, dedicación y consejos para mejorar la calidad de esta tesis.*

*A nuestro amigo incondicional **Gonzalo Siu M.** por guiarnos, creer en nosotros y asesorarnos en este gran camino, que empiece la aventura.*

*Al **Dr. Carlos Salazar López Ortiz** y a **HISPAREP** por permitirnos aprender al lado de su equipo.*

*A **Ricardo, Héctor, Laura y Joaquín** por compartirnos su experiencia y hacer amena nuestra estancia.*

Agradecimientos de Miriam Nava Muciño

A mis papás:

Porque siempre han sido mi motor y aunque tuvieron al inicio una niña que era flojita, le costaba la escuela y era demasiado distraída y soñadora, siempre fueron su guía y con su ejemplo, le mostraron el camino, diciéndole: La única herencia que te podemos dejar es el conocimiento, gracias a eso, hoy siempre trato de dar lo mejor, soy muy curiosa y me encanta aprender. Los amo con todo mi corazón y siempre serán mi ejemplo a seguir.

Gracias papá por enseñarme a luchar, por siempre impulsarnos en todos nuestros sueños y enseñarnos a siempre expresar lo que pensamos, a ayudar al prójimo, a pensar y dar lo mejor día a día.

Gracias mamá por tu amor, por todos los días demostrarnos que nos amas, por obligarme a hacer mi tarea o leer de chiquita aunque te hiciera berrinche y por ser siempre el ejemplo de todos por tu gran curiosidad y ganas de aprender.

A mis hermanos:

Manito, gracias por ser una guía para mí, sabes que te tengo un gran cariño. Siempre me has apoyado y aconsejado. Gracias por cuidarnos siempre y jugar con nosotras a tener negocios, monopolí, etc. Eres el mejor hermano y te amo.

Aquí también aprovecho para agradecer a Chinis, por siempre tener pláticas agradables conmigo, hacer feliz a mi hermano y darnos al tesoro de la familia, eres una hermana para mí.

Diana, eres una gran mujer, gracias por siempre ver por todos y ser un gran apoyo. Siempre has tratado de hacer lo mejor para darnos el ejemplo y evitar que caigamos, muchas gracias por eso. Gracias por tus consejos.

Kalíz, gracias por tu alegría y por siempre darnos sonrisas a todos. Gracias por las pláticas y consejos. Eres una mujer muy luchadora, estoy muy orgullosa de todos tus logros.

A mi pequeña Valentina, porque aunque eres una bebé, llegaste a hacernos feliz nuestros días, eres nuestra luz.

A Aimarita, gracias por ser nuestra compañera y hermana chiquita, desde pequeña has mostrado tu gran inteligencia y corazón. A pesar de la diferencia de edad, me encanta tu plática y consejos, te amo pequeña.

A mis tíos:

A mi segunda mamá, mi tía Patricia, gracias por tu paciencia y porque siempre aguantabas a tu bola de chamacas en tu cuarto a pesar de que nos corrías y no nos íbamos, tú fuiste alguien importante para que mi infancia fuera muy feliz. Gracias por enseñarnos a hacer cazuelitas de lodo y a vender peras! Te amo.

A mi madrina Cary, gracias por siempre apoyarme y nunca dejarme sola. Siempre te he admirado y has sido una mujer muy interesante para mí. Siempre recordare como preparaba bolsitas de té contigo, me ponía tus zapatos y sentada en tus piernas, sacaba todo lo de tu bolsa y terminaba poniéndome tu bile.

A mi tío Jonathan, aunque tuvimos una infancia con preparación para la guerra a tu lado, gracias por cuidarnos y contarnos chistes, eres el tío más chistoso y galán! Gracias por pasearnos a tu bola de sobrinas y enseñarnos a bailar de una forma muy divertida.

Y agradezco a todos los tíos Muciño Montoya y Nava Gutierrez, porque gracias a todos soy una mujer feliz, curiosa y estudiosa.

A mis primos:

A Adriana, gracias por nunca dejarme sola desde que soy chiquita, eres mi hermana mayor y me encanta que el cariño que tú me tienes sea una casada, ya que yo así quiero a tus hijos.

A Metz y Chucho, gracias por siempre apoyarme y aconsejarme, los admiro muchísimo y me encanta platicar con ustedes. Gracias por siempre tratarnos como grandes y querer lo mejor para nosotras. También gracias por confiarnos a Sebastián para guiarlo y cuidarlo.

A Rita, Amanda, Clarita, Ita, Montse y Raul, gracias por ser mis compañeros desde mi infancia, a pesar de la distancia, enojos o procesos de la vida, son unos hermanos para mí y siempre contarán conmigo, los amo.

También agradezco a todos los primos que me faltan, todos están en mi corazón.

A la familia Calderón Ponce, gracias por tratarme como un miembro más de la familia, por siempre hacerme sentir bien y preocuparse por mí, el cariño es mutuo. Con ustedes he pasado momentos muy divertidos.

A doña Julia y don Toño, gracias por siempre mostrarme su cariño, los quiero mucho.

A Alberto Calderón Ezequiel Ponce:

Gracias por ser mi compañero aproximadamente por 5 años y medio. Hemos vivido momentos buenos y malos, pero siempre estaré agradecida por conocerte. Desde que te conocí sentí una gran confianza hacia ti y luego, luego te volviste mi mejor amigo. Gracias por siempre cuidarme y preocuparte por que estuviera bien. Le has dado a mi vida mucha felicidad y momentos agradables. Gracias por ser mi compañero durante la tesis, ya que fuiste mi sostén, hiciste que los momentos malos se volvieran más livianos y siempre trataste de hacerme sonreír aunque me costara. Eres una persona muy capaz, inteligente y con un gran corazón. Deseo que esto sea el fin de una gran etapa, pero un gran inicio en la vida de los grandes. Deseo también que sigas pensando en grande y que todos esos sueños se hagan realidad!

Con cariño

Miriam NM

AGRADECIMIENTOS ALBERTO C.

Papá

Mi primer contacto con la universidad fue hace muchos años, recuerdo aquel día perfectamente pues te acompañe a la Facultad de Derecho, habíamos ido a recoger tu anillo de graduación. Me di cuenta que tenía un gran compromiso al prometerte que un día yo iba a tener uno...

Muchas gracias por todo el apoyo y consejos en todo momento, siempre que necesite algo tú ya lo tenías en las manos, es por tu presencia que hoy día logramos culminar este trabajo y proyecto de vida.

Mamá

No tengo palabras para expresar y agradecer todo lo que me has dado en cada etapa de mi vida, gracias a ti hemos logrado llegar a la meta, pues este logro es de ambos. Me has enseñado a trabajar fuerte, hacer todo por destacar y no rendirme ante nada. Gracias por estar siempre a mi lado para escucharme, darme consejo y apoyarme.

Te quiero mucho mamá... hasta el cielo.

A Mariana

Por hacerme reír con tus ocurrencias todo el tiempo, además de regalarme una sonrisa cuando lo creíste oportuno. Por darme tu tiempo y escucharme así como por los consejos. Continúa trabajando fuerte y con la dedicación que solo tú conoces.

A Paola

Por mostrar esa entereza y esa sonrisa pícaro, que sin duda alguna me sirvió para continuar cuando las cosas se ponían complicadas. Paolita estas a muy poco tiempo de encontrarte en mis zapatos, cierra fuerte y con broche de oro!

Hermanitas ustedes fueron un motor fundamental en la realización de este trabajo. Han sido una inspiración para mí y quiero que este trabajo las inspire de igual manera.

A mis abuelitos

Por ser una guía a lo largo de TODA mi vida, este trabajo tiene una especial dedicación para ustedes.

Abuelito en mi mente siempre está el recuerdo de cuando me llevabas a la escuela a paso veloz, hablándome de la importancia de la puntualidad, son esos mismos pasos los que hoy me ayudaron a dar este gran salto.

Abuelita gracias por estar siempre al pendiente de mí, por darme todo lo que estaba en tus manos y que yo necesite, gracias por todos tus consejos, particularmente por prevenirme de las cosas brindándome toda tu experiencia.

A Leopoldo, Ana y Leslie

Por su gran amistad, apoyo y momentos de largas charlas para darme su consejo, parece que fue ayer cuando iniciaba mi carrera al tiempo que nos conocíamos.

Familia Pineda Ferrer

Por todo su apoyo y guía a lo largo de este trabajo, y desde el inicio de mi carrera, por ayudarme a levantar la cara cuando era necesario, por llenarme de ánimo, fuerza, y energía para todas las cosas. Angélica y Raúl gracias por estar en mi vida.

Familia Nava Muciño

Gracias por el apoyo en la realización de este trabajo todos y cada uno tuvieron una gran participación en él, gracias por recibirme siempre con una sonrisa y por abrirme las puertas de su hogar.

Miriam Nava M.

Podría apostarte que cuando nos conocimos no imaginabas que íbamos a terminar un trabajo de tesis juntos... yo tampoco jaja.

Sin embargo ha sido una de las experiencias más enriquecedoras y más fuertes que he tenido en toda mi vida, MIRIAM NAVA, me enseñaste el verdadero significado de trabajo en equipo. Trabajar en equipo es preocuparse por el paso que va a dar el otro, estar un paso adelante y hacer hasta lo imposible por evitar que caiga. Trabajar en equipo es entregar el alma por el otro, buscando armonía entre ambas partes.

Gracias por ser, amiga, confidente, cómplice y por todo el apoyo que me brindaste a cada momento, no me alcanzaría una tesis completa para describir lo que has hecho por mí, no solo respecto a este trabajo sino en toda mi persona.

Gracias por todas esas tardes llenas de emociones; risas, sustos, enojos, alegrías y más. Por esos días de consejos, pláticas interminables en las que el tema era lo menos importante.

Pero sobre todo gracias por darme siempre la sonrisa más dulce y por ser la mejor compañera de tesis...

Alberto C.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. MARCO TEÓRICO.....	3
1. Aparato reproductor masculino	3
2. Esteroidogénesis.....	13
3. Espermatogénesis	14
4. Eje hipotálamo - hipófisis - testículo	19
5. Espermatozoide	21
6. Eyaculación.....	23
7. Infertilidad	24
8. Análisis seminal	25
9. Reproducción asistida.....	26
10. Banco de semen.....	27
11. Criopreservación	29
12. ADN.....	35
13. ADN espermático.....	36
14. Fragmentación del ADN.....	37
15. Técnicas de evaluación de la fragmentación del ADN	41
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
IV. HIPÓTESIS	46
V. OBJETIVOS	46
1. General	46
2. Particulares	46
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Recolección de la muestra	47
2. Análisis seminal	47
3. Electroforesis unicelular en gel (EUG).....	50
4. Análisis estadístico.....	53
VII. RESULTADOS	55
1. Análisis seminal antes y después de la criopreservación de muestras de semen de pacientes y donantes de banco	55
2. Evaluación del índice de daño en el ADN espermático pre y post-congelación de muestras de semen de pacientes y donantes.....	56
VIII. DISCUSIÓN	65

IX. Conclusiones.....	72
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

I. RESUMEN

La infertilidad es la imposibilidad de lograr un embarazo después de 12 meses de relaciones sexuales sin protección, la cual ha aumentado en los últimos años. La frecuencia de parejas infértiles a nivel mundial se sitúa entre el 10 y 15%. El factor masculino está involucrado el 35% de los casos. La calidad seminal del varón ha ido disminuyendo debido a factores ambientales, estrés, localización geográfica, estilo de vida, entre otros. La OMS 2010 establece los parámetros de referencia para la evaluación seminal, sin embargo no toma en cuenta la integridad del material genético.

Debidos a los problemas de infertilidad que tienen muchas parejas, se recurre a los bancos de semen. El banco de semen permite criopreservar, almacenar, procesar y distribuir muestras seminales. Se ha estudiado ampliamente el proceso de congelación del material biológico, las células criopreservadas se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido. En los espermatozoides, se han presentado avances en la preservación espermática, sin embargo del 25 al 75% mueren o tienen daños irreversibles en el espermatozoide, los más importantes son las rupturas de una o ambas hebras del ADN.

Por lo anterior en este estudio se determinó el grado de fragmentación del ADN espermático de muestras de semen de donantes y de pacientes, criopreservadas por las técnicas convencional y rápida mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel a pH alcalino (12.1) y neutro (9). Se utilizó un total de 15 muestras de semen (11 donantes, 4 pacientes) criopreservadas por las técnicas de congelación convencional y rápida, además de un control negativo (semen sin tratamiento) y un control positivo (semen tratado con peróxido de hidrogeno al 30%) en las cuales se estimó el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides. Los resultados obtenidos mostraron que el proceso de congelación/descongelación afecta considerablemente los parámetros seminales tal como movilidad y vitalidad independiente de la técnica de congelación utilizada, además se observó que la congelación rápida conservó en mayor proporción la integridad del ADN espermático mostrando menor daño de hebra simple y doble respecto a la congelación convencional. Finalmente, tanto el análisis seminal como la electroforesis unicelular en gel son buenos indicadores para evaluar la calidad espermática de donantes y pacientes después de la congelación rápida y convencional. En base a los datos se puede recomendar que además de la evaluación seminal de la OMS 2010, se incluyan pruebas para evaluar el daño al ADN espermático y tener mayor información de la calidad seminal del varón previo a los tratamientos de reproducción asistida.

II. INTRODUCCIÓN

En las parejas la dificultad de obtener un embarazo con éxito origina una situación que en los últimos años está representando un problema creciente en la salud pública. La incapacidad de obtener un embarazo, que finalice con un recién nacido vivo después de un año de relaciones sexuales sin protección se define como infertilidad. Actualmente se ha determinado a nivel mundial que alrededor del 10 y 15% de las parejas en edad reproductiva presentan problemas de fertilidad. Se estima que el factor masculino está comprometido en aproximadamente un 40% de los casos (Rosas 2007, Acosta y Dueñas 2014).

Diversos estudios han mostrado una disminución en la calidad del semen que puede deberse a factores ambientales, como la temperatura, la radiación, los fármacos, el estrés, los estimulantes (drogas, alcohol, tabaco), la deficiencia de nutrientes (selenio, zinc, vitaminas), también puede influir la edad, diferencias endocrinas, étnicas, localización geográfica, estilo de vida, entre otras. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció los parámetros básicos que se deben de analizar en el estudio del factor masculino de forma rutinaria; aun así, se estima que aproximadamente del 10 al 15% de los varones infértiles presentan parámetros normales, lo cual es un problema al momento de diagnosticar la fertilidad (Morales *et al* 2007, Rosas 2007, Acosta y Dueñas 2014).

Se ha determinado que la capacidad de fertilización del espermatozoide no solo depende de los parámetros seminales sino también de la integridad del ADN espermático. El daño al material genético es importante en el estudio de la infertilidad masculina y su análisis debe ser considerado como una prueba de rutina en el estudio seminal. Diversos autores han correlacionado los valores de fragmentación del ADN espermático obtenidos en las técnicas de reproducción asistida para establecer el porcentaje de éxito de un embarazo (Morales *et al* 2007, Acosta y Dueñas 2014).

III. MARCO TEÓRICO

1. Aparato reproductor masculino

El aparato reproductor masculino con el tiempo a conseguido una gametogénesis continua durante toda la vida, para posteriormente ser introducidos en el aparato reproductor femenino a través de la copula. El aparato reproductor masculino consta de órganos sexuales primarios (testículos), que producen los gametos y los órganos sexuales secundarios (pene, vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales y epidídimo), todos ellos son necesarios para la reproducción. Constituyen un sistema de conductos y glándulas, relacionados con el almacenamiento, la supervivencia y el transporte de los espermatozoides (Figura 1) (Koeppen Stanton 2009, Saladin 2013, <http://m.exam-10.com/medicina/31239/index.html>).

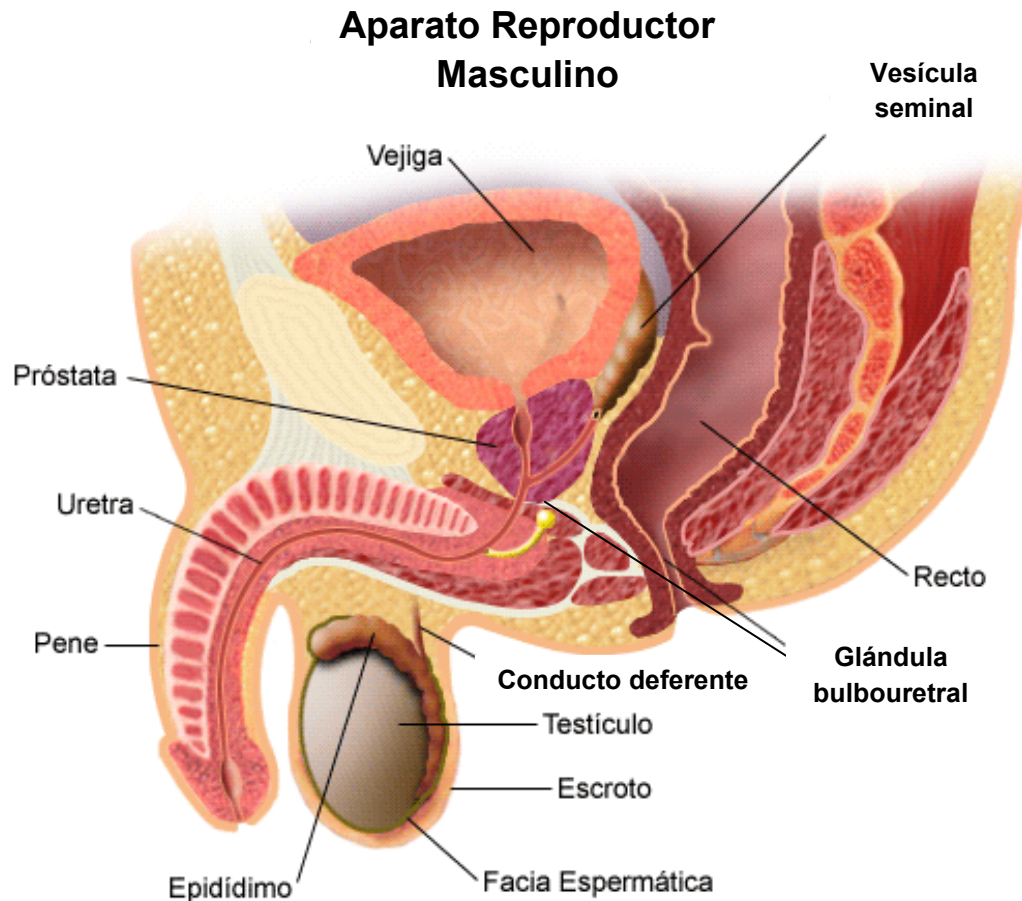


Figura 1. Componentes del aparato reproductor masculino (tomado y modificado de <http://m.exam-10.com/medicina/31239/index.html>).

El pene

La anatomía del pene permite separar las paredes de la vagina, atravesar el espacio potencial de la luz vaginal y depositar el semen en su extremo distal, cerca del cérvix. Este proceso de inseminación interna sólo se puede realizar si el pene está rígido por la erección, la cual es controlada por dos porciones del sistema nervioso central, el hipotálamo en el encéfalo y la porción sacra de la médula espinal. La mitad del órgano es una raíz interna y la otra mitad es un tallo y un glande, visibles desde el exterior. Las dimensiones del pene cuando está flácido son 8 a 10 cm de largo y 3 cm de diámetro; las dimensiones típicas cuando está erecto es de 13 a 18 cm de largo y 4 cm de diámetro. El glande es la cabeza expandida en el extremo distal del pene, con un orificio uretral extremo en su punta. La piel está unida de manera laxa a lo largo de su tallo, lo que permite la expansión durante la erección y continúa sobre el glande, como prepucio. Un pliegue ventral de tejido al que se le denomina frenillo une la piel al glande, la cual es más delgada y está unida de manera firme al tejido eréctil subyacente. El glande y la superficie del frente del prepucio tienen glándulas sebáceas que producen una secreción serosa denominada esmegma (Koeppen y Stanton 2009, Fox 2014, Saladin 2013).

El pene contiene tres cuerpos cilíndricos a los que se les denomina tejidos eréctiles, que se llenan con sangre durante la excitación sexual, en donde se obstruye parcialmente el flujo sanguíneo de las venas que son responsables de su agrandamiento y erección. Un solo cuerpo eréctil, el cuerpo esponjoso, pasa a lo largo del lado ventral del pene y rodea la uretra peneana. Se expande en el extremo distal para llenar todo el glande. Proximal a éste, el lado dorsal tiene un cuerpo cavernoso a cada lado. Cada uno está cubierto por una túnica albugínea fibrosa y están separados entre sí por un tabique medial. Los tres cilindros del tejido eréctil tienen un aspecto esponjoso y contienen cuantiosos senos de sangre a los que se les denomina lagunas. Las particiones entre lagunas, a las que se les llama trabéculas, están compuestas de tejido y músculo trabecular liso. En el pene flácido, el tono muscular trabecular colapsa las lagunas, que aparecen como pequeñas aperturas en el tejido (Figura 2) (Fox 2014, Saladin 2013, <http://www.datuopinion.com/tejido-erectil>).

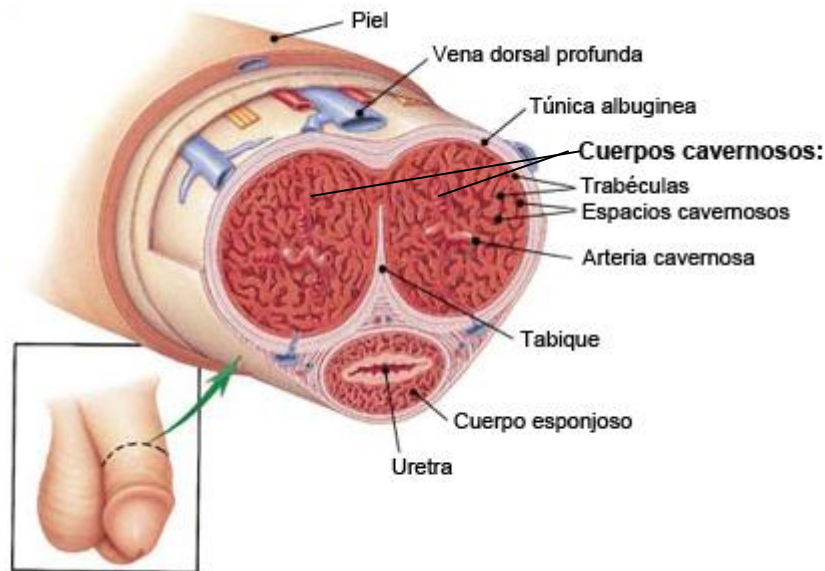


Figura 2. Partes en las que se conforma el pene y la uretra (tomada de <http://www.datuopinion.com/tejido-erectil>).

Uretra

El aparato reproductor y el urinario comparten la uretra masculina. Está mide aproximadamente 18 cm de largo y consta de tres regiones: Las uretras prostática, membranosa y esponjosa. La uretra esponjosa mide alrededor de 15 cm de largo y atraviesa el pene hasta el orificio uretral externo, recibe su nombre del cuerpo esponjoso del pene por el que pasa. Aunque tiene funciones urinarias y reproductoras no puede pasar orina y semen al mismo tiempo (Figura 2) (Saladin 2013, <http://www.datuopinion.com/tejido-erectil>)

Las vesículas seminales

Las vesículas seminales son un par de glándulas en la parte posterior de la vejiga urinaria; cada una está relacionada con un conducto deferente, durante la emisión de semen, la contracción del conducto coincide con la contracción de las capas musculares de las vesículas, cada una mide 5 cm de largo. La vesícula seminal tiene una cápsula de tejido conjuntivo y una capa inferior de músculo liso, la parte secretora es un túbulo muy contorneado con varias ramas que forman un laberinto complejo. El conducto se vacía en el conducto eyaculador (Koeppen y Stanton 2009, Saladin 2013).

La secreción amarillenta de las vesículas seminales presenta un pH alcalino, aporta aproximadamente el 70% del volumen total del eyaculado. Estas glándulas son la principal fuente de fructosa, ácido cítrico y otras sustancias nutritivas, también segregan semenogelinas que inducen la coagulación del semen al producirse la eyaculación, así como grandes cantidades de prostaglandinas y fibrinógeno (Figura 3) (Koeppen y Stanton 2009, Hall y Guyton 2011, Saladin 2013, <http://kerchak.com/sistema-reproductor-masculino/>).

La próstata

La próstata rodea la uretra y los conductos eyaculadores en sentido inmediato inferior a la vejiga urinaria. Mide 2 x 4 x 3 cm, y es un agregado de 30 a 50 glándulas tubuloacinares compuestas y encerradas en una sola cápsula fibrosa. Estas glándulas se vacían por medio de 20 poros en la pared uretral. El estroma de la próstata consta de tejido conjuntivo y músculo liso, como el de las vesículas seminales. La secreción de la próstata es ligeramente densa y lechosa, constituye el 20% del semen, secreción ácida que es rica en citrato, calcio, zinc, espermina, profibrinolisisina y fosfatasa ácida, además de contener el antígeno prostático específico, que es una proteasa de cerina que licua el semen coagulado en unos pocos min (Figura 3) (Koeppen y Stanton 2009, Hall y Guyton 2011, Saladin 2013, <http://kerchak.com/sistema-reproductor-masculino/>).

Las glándulas bulbouretrales

Las glándulas bulbouretrales o de Cowper reciben ese nombre por su posición cerca del bulbo dilatado en el extremo interno del pene y su relación con la uretra. Son de color café, esféricas, de 1 cm de diámetro y con un conducto de 2.5 cm a la uretra. Durante la excitación sexual se vacían en la uretra peneana antes de la emisión y la eyaculación. Esta secreción, que protege a los espermatozoides al neutralizar la acidez de la orina residual en la uretra, contiene mucho moco, lo que lubrica, limpia y bloquea la uretra (Figura 3) (Koeppen y Stanton 2009, Saladin 2013, <http://kerchak.com/sistema-reproductor-masculino/>).

SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO (vista posterior)

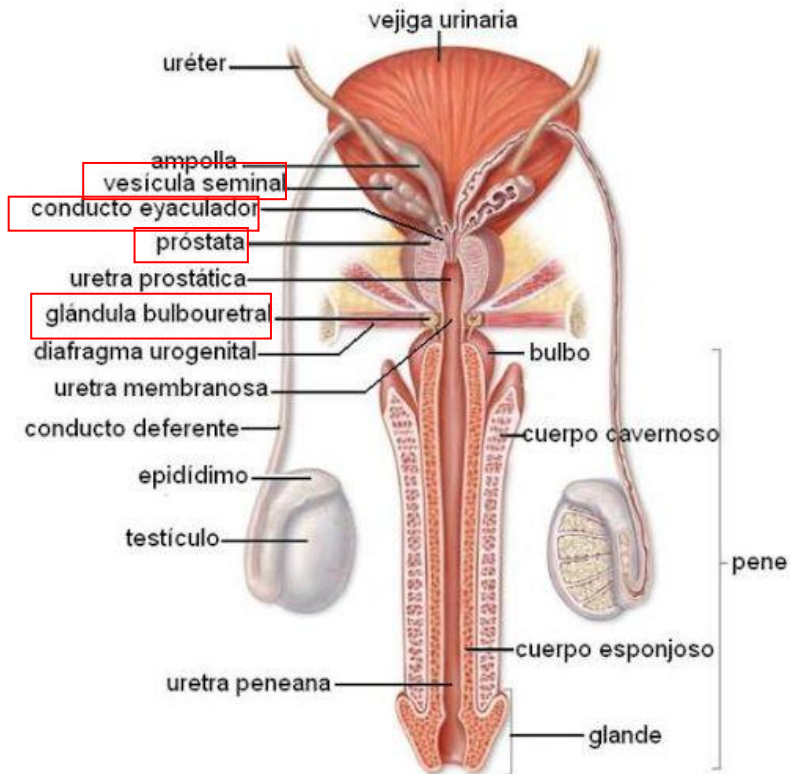


Figura 3. Glándulas del aparato reproductor masculino (tomada de <http://kerchak.com/sistema-reproductor-masculino/>).

Después de dejar los testículos, los espermatozoides viajan por una serie de conductos espermáticos para alcanzar la uretra: conductos eferentes, conducto del epidídimo, conducto deferente y conducto eyaculador (Saladin 2013).

Conductos eferentes

Los conductos eferentes son 12 pequeños conductillos eferentes que surgen de los testículos y transportan a los espermatozoides al epidídimo. Tienen grupos de células ciliadas que ayudan a impulsar a los espermatozoides (Figura 4) (Saladin 2013, <http://slideplayer.es/slide/4001276/>).

El epidídimo y el conducto del epidídimo

Los espermatozoides son transportados de los túbulos seminíferos a conductos eferentes denominados *rete testis* conectados con el epidídimo, el cual es un sitio donde se maduran y almacenan los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación. El

epidídimo se adhiere al lado posterior de los testículos; mide aproximadamente 7.5 cm de largo y se conforma de una cabeza parecida a un mazo en el extremo superior, un cuerpo de largo medio y una cola más delgada en su extremo inferior. Contiene un solo conducto enrollado, de 6 m de largo, incrustado en tejido conjuntivo. Este conducto reabsorbe aproximadamente el 90% del líquido secretado por los testículos. Los espermatozoides cuando dejan los testículos son inmaduros, desde el punto de vista fisiológico y van madurando a medida que viajan por la cabeza y cuerpo del epidídimo. En 20 días alcanzan la cola y se almacenan allí y en la parte adyacente del conducto deferente. Los espermatozoides almacenados siguen siendo fértiles de 40 a 60 días, pero si envejecen antes de ser eyaculados, el epidídimo los reabsorbe (Figura 4) (Tresguerres *et al* 2010, Saladin 2013, <http://slideplayer.es/slide/4001276/>).

Conducto deferente

El conducto del epidídimo sale directo de la cola, gira 180° y se vuelve el conducto deferente también llamado vaso deferente. Es un conducto muscular de 45 cm de largo y 2.5 mm de diámetro. Pasa por arriba del cordón espermático y el conducto inguinal e ingresa en la cavidad pélvica. Allí, gira en sentido medial y se acerca a la vejiga urinaria. Después de pasar entre la vejiga y el uréter, el conducto gira hacia abajo, detrás de la vejiga, y se ensancha en la ampolla terminal. El conducto deferente termina al unirse con el conducto de la vesícula seminal. El conducto tiene una luz muy estrecha y una pared gruesa de músculo liso inervado por fibras nerviosas simpáticas. La función principal es la de transportar espermatozoides desde el epidídimo hacia el conducto eyaculador mediante contracciones (Figura 4) (Fox 2014, Saladin 2013, <http://slideplayer.es/slide/4001276/>).

Conducto eyaculador

La unión del conducto deferente y el de la vesícula seminal, forma un corto conducto eyaculador (2 cm) que atraviesa la próstata y se vacía en la uretra. El conducto eyaculador es el último de los conductos espermáticos (Figura 3) (Saladin 2013, <http://kerchak.com/sistema-reproductor-masculino/>).

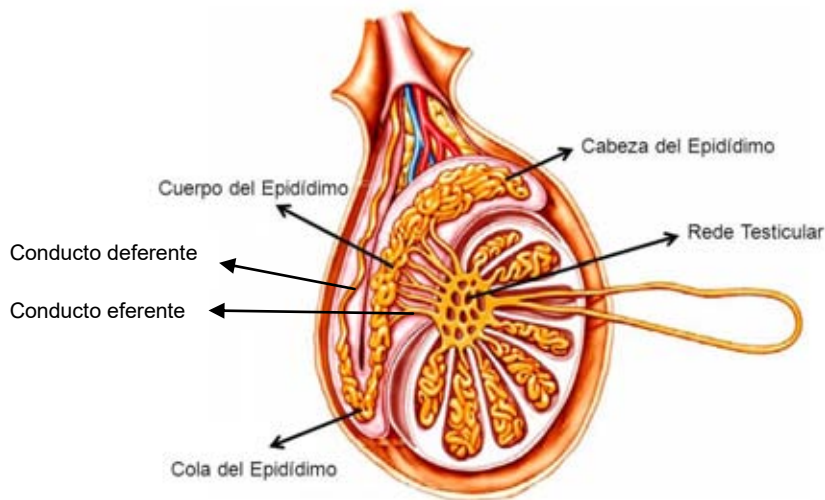


Figura 4. Conducto eferente, deferente y epidídimo (tomada y modificada de <http://slideplayer.es/slide/4001276/>).

El escroto

El escroto es una bolsa colgante de piel, músculo y tejido conjuntivo fibroso, que contiene los testículos. La piel tiene glándulas sebáceas y una pigmentación más oscura que el resto. El escroto es dividido en compartimientos izquierdo y derecho por un tabique mediano interno que protege a cada testículo de las infecciones que pudieran afectar al otro. La ubicación del tabique está marcada en el exterior por una división denominada rafe perineal, que también se extiende en sentido anterior a lo largo del lado ventral del pene y, en sentido posterior hasta el margen del ano. El testículo izquierdo suele estar suspendido más abajo que el derecho, de modo que no se compriman los dos entre sí contra los músculos (Saladin 2013).

En sentido posterior, el escroto contiene el cordón espermático, un haz de tejido conjuntivo fibroso que posee el conducto deferente (un conducto espermático), vasos sanguíneos y linfáticos y nervios testiculares. Pasa por los testículos, donde se le palpa con facilidad a través de la piel del escroto. El cordón espermático continúa a lo largo del lado anterior del pubis, hacia un conducto inguinal de 4 cm de largo, el cual atraviesa los músculos de la ingle y emerge en la cavidad pélvica. La entrada anterior en el conducto inguinal es el anillo inguinal y su salida superior en la cavidad pélvica es el anillo inguinal interno. Esta localización mantiene la temperatura testicular 2 °C por debajo de la corporal, algo esencial para el desarrollo óptimo de los espermatozoides, por ello el

escroto para regular la temperatura de los testículos tiene un mecanismo que se compone por: (Koeppen y Stanton 2009, Saladin 2013).

- El músculo cremáster: Son tiras de músculo abdominal oblicuo interno que cubre como una malla el cordón espermático. Cuando esta más de 3 °C por bajo de la temperatura corporal, se contrae. Cuando hace calor, el cremáster se relaja y los testículos se suspenden más lejos del cuerpo.
- El músculo dartos: es una capa subcutánea de músculo liso. También se contrae cuando hace frío, y el escroto se vuelve tenso y rugoso. La dureza del escroto ayuda a mantener los testículos con comodidad contra el cuerpo caliente y reduce la superficie del escroto, con lo que se reduce la pérdida de calor.
- El plexo pampiniforme: está formado por una red extensa de venas que rodean la arteria testicular en el cordón espermático. A medida que atraviesan el conducto inguinal, estas venas convergen para formar la vena testicular, que emerge del conducto en la cavidad pélvica. Sin el plexo pampiniforme, la sangre arterial caliente elevaría la temperatura de los testículos e inhibiría la producción de espermatozoides. Sin embargo, el plexo pampiniforme evita esto al actuar como un intercambiador de calor a contracorriente. El cordón espermático retira el calor de la sangre arterial descendente. De modo que cuando alcanza los testículos, esta sangre está entre 1.5 a 2.5 °C más fría que la temperatura central del cuerpo (Saladin 2013).

Los testículos

Los testículos son glándulas endocrinas y exocrinas combinadas que producen hormonas sexuales y espermatozoides, se localizan fuera de la cavidad del cuerpo. Cada testículo es ovalado y un poco aplanado, aproximadamente de 4 cm de largo, 3 cm de anterior a posterior y 2.5 cm de ancho. Sus superficies anterior y lateral están cubiertas por una túnica vaginal. Los propios testículos tienen una cápsula blanca fibrosa a la que se le denomina túnica albugínea. El tabique de tejido conjuntivo se extiende de la cápsula hacia el parénquima, dividiéndola en 250 a 300 lobulillos con forma de cuña. Cada lobulillo contiene uno de tres túbulos seminíferos (conductos delgados de hasta 70 cm de largo donde se producen los espermatozoides). Entre los túbulos seminales hay grupos de células intersticiales o de Leydig; la fuente de testosterona (Figura 5) (Nason 1983,

Saladin 2013, <http://somosequipo5.blogspot.mx/2013/09/practica-4-anatomia-del-testiculo.html>).

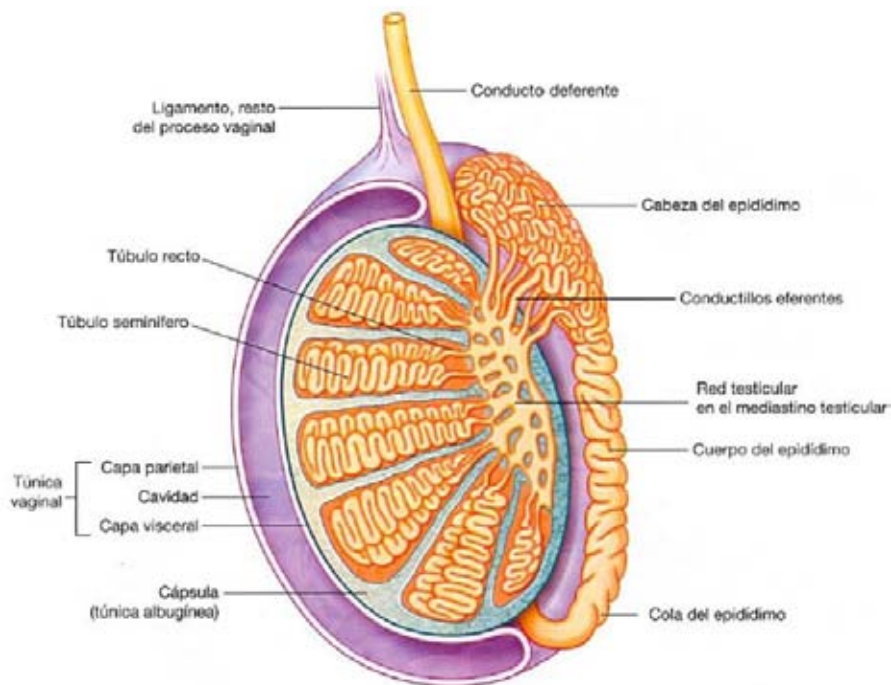


Figura 5. Organización de los testículos y el epidídimo (tomada de <http://somosequipo5.blogspot.mx/2013/09/practica-4-anatomia-del-testiculo.html>).

La presencia de los túbulos seminíferos genera dos compartimentos dentro de cada lobulillo. El primero es un compartimento intratubular, que está constituido por el epitelio seminífero del túbulo y el otro es un compartimento peritubular, que se corresponde con los elementos neurovasculares, las células del tejido conjuntivo, las células inmunitarias y las células intersticiales de Leydig. Los túbulos seminíferos tienen una luz estrecha cubierta por un epitelio germinal grueso. El epitelio consta de varias capas de células germinales que se encuentran en proceso de convertirse en espermatozoides, y una menor cantidad de células de Sertoli, que protegen a las células germinales y promueven su desarrollo. Los túbulos conducen a una red denominada red testicular, insertada en la cápsula, en el lado posterior de los testículos. Los espermatozoides comienzan a madurar en la red y se mueven debido al flujo de líquido secretado en las células de Sertoli y por los cilios de algunas células reticulares. Los espermatozoides no nadan mientras están en el aparato reproductor masculino. Las células germinales dependen de las células de Sertoli para obtener nutrientes, eliminar desechos, recibir factores de crecimiento, entre otras funciones. Las células de Sertoli también secretan dos proteínas denominadas

proteína de fijación a andrógenos e inhibina, ambas regulan la producción de espermatozoides (Koeppen y Stanton 2009, Saladin 2013).

Las células de Sertoli son las verdaderas células epiteliales y se extienden desde la lámina basal hasta la luz. Las células rodean a los espermatozoides, les dan soporte estructural dentro del epitelio y establecen uniones adherentes y en hendidura con las células espermáticas en todos los estadios madurativos. Mediante la formación y rotura de estas uniones, las células de Sertoli guían a las células espermáticas hacia la luz conforme progresan a estadios de la espermatogénesis más avanzados. La espermiación obliga a una rotura final de las uniones entre las células espermáticas y las de Sertoli. Otra característica de estas células es la formación de uniones estrechas entre ellas mismas, uniones que dividen el epitelio seminífero (Koeppen y Stanton 2009).

Cada testículo es irrigado por una arteria testicular que surge de la aorta abdominal, justo debajo de la arteria renal. Es una arteria muy alta y delgada que se enrolla hacia abajo de la pared abdominal posterior antes de atravesar el conducto inguinal hacia el escroto. El flujo sanguíneo es muy exiguo y los testículos reciben un suministro escaso de oxígeno. En respuesta a ello los espermatozoides desarrollan mitocondrias grandes que les ayuda a vivir en el entorno hipóxico del aparato reproductor femenino (Saladin 2013).

En las paredes de los túbulos se inicia la espermatogénesis, ya que se encuentran células germinales primordiales, las cuales se desarrollan y forman espermatozoides maduros, auxiliadas por las células de Sertoli. Entre los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig, en las cuales se lleva a cabo la esteroidogénesis y como producto final generan la testosterona (Figura 6) (Kerr *et al* 2006, Cohen y Taylor 2009, http://163.178.103.176/Fisiologia/fendocrino/ejercicios/ejercicio2/endo_ejercicio2_5.html).

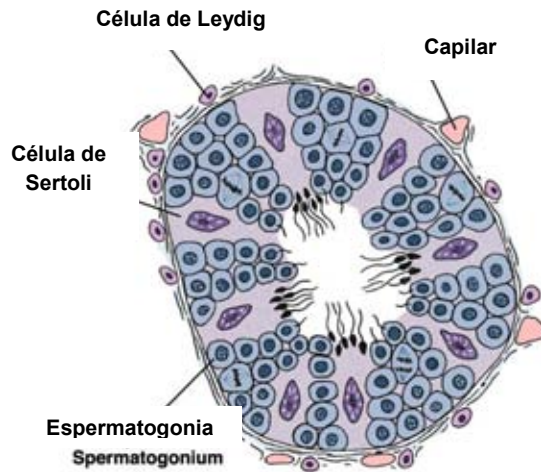


Figura 6. Células de Sertoli y células de Leydig (tomada y modificada de http://163.178.103.176/Fisiologia/fendocrino/ejercicios/ejercicio2/endo_ejercicio2_5.html).

2. Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es la producción de andrógenos por las células de Leydig, a partir de colesterol, siendo su principal producto la testosterona. En la ruta biosintética el primer producto obtenido del colesterol mediante la enzima **P450 scc** es la pregnenolona, la cual por la enzima P450C17 se hidroxila en la posición 17 a 17 α -hidroxipregnenolona, sufriendo segmentaciones en la cadena lateral y por la enzima P450C17 origina la dehidroepiandrosterona, la cual tiene dos caminos, ya sea producir androstenediona por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) y penetra en las células de Sertoli; o el otro camino en la conversión a androstenediol por la 17 β -HSD y por la esteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) se produce la testosterona, la cual va a las células de Sertoli donde por medio de la aromatasa se convierte a 17 β -Estradiol o por la enzima 5 α -reductasa se convierte en dihidrotestosterona. La testosterona estimula los órganos sexuales masculinos, favorece el desarrollo de las características sexuales secundarias en el hombre y es necesaria para la espermatogénesis (Figura 7) (Griswold y McLean 2006, Cohen y Taylor 2009).

Para que se realicen la espermatogénesis y la esteroidogénesis es elemental la participación correcta del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Tresguerres *et al* 2010, <http://www.uv.mx/eneurobiologia/en/vols/2011/4/Rojas/HTML.html>).

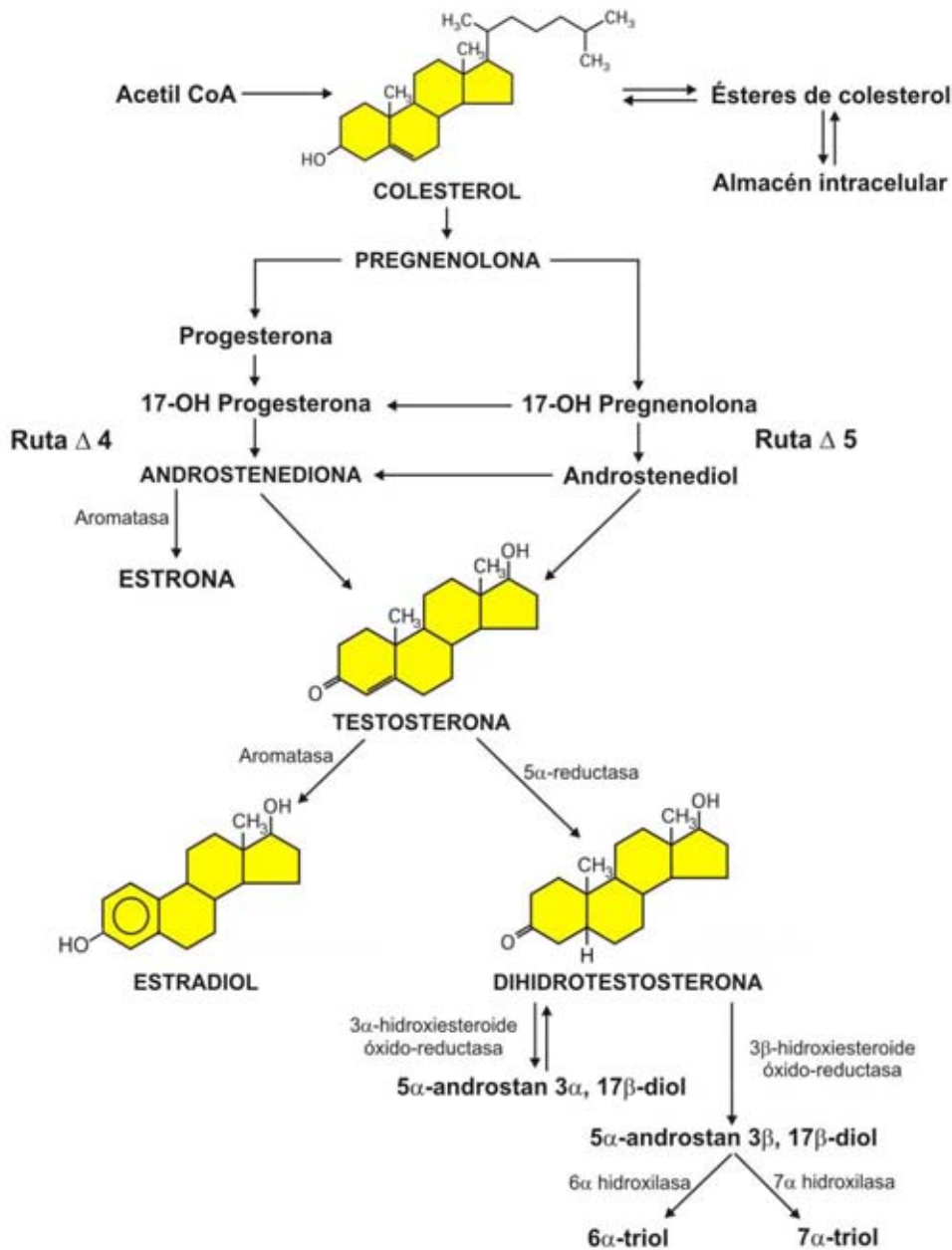


Figura 7. Proceso de esteroidogénesis (tomando de <http://www.uv.mx/eneurobiologia/en/vols/2011/4/Rojas/HTML.html>).

3. Espermatogénesis

En los túbulos seminíferos las células de Sertoli son las más grandes, extendidas en forma radial desde la membrana basal en dirección a la luz del túbulo. Además de ser el sostén y nutrir a las células germinales, también tienen receptores hormonales, participan en el transporte de sustancias dentro de túbulo seminífero, el metabolismo de las células germinales, el control de la espermatogénesis y la producción de sustancias que controlan

las concentraciones de la hormona estimulante del folículo (FSH) (Griswold y McLean 2006).

Las células de Sertoli por medio de uniones de hemi-desmosomas están en contacto con la membrana basal del túbulo seminífero, impidiendo el paso de sustancias desde el intersticio testicular hasta el interior de los túbulos y formando la denominada barrera hematotesticular. Las células de Sertoli son altamente selectivas ya que tienen receptores para FSH y sintetizan una serie de sustancias biológicamente activas. Los metabolitos producidos en respuesta a la FSH incluyen gran cantidad de intermediarios energéticos como el lactato, transferrina y la ceruloplasmina, que se secretan a la luz del túbulo seminífero. Las células germinales utilizan estos productos para llevar a cabo el metabolismo con efectividad. Las células germinales se encuentran una a otra englobadas dentro del citoplasma de las células de Sertoli e incluso los cuerpos residuales por la espermatogénesis son fagocitados por ellas (Griswold y McLean 2006).

Las células de Sertoli sintetizan la proteína de unión a andrógenos (ABP, por sus siglas en inglés) que actúa como transportadora de testosterona a través de la barrera hematotesticular. La testosterona que penetra en el túbulo seminífero se transforma en 5- α -dihidrotestosterona (DHT) mediante la reducción del doble enlace del anillo A. La ABP introduce al túbulo seminífero grandes cantidades de testosterona necesarias para la espermatogénesis (Griswold y McLean 2006).

Los túbulos seminíferos presentan un epitelio de 4 a 8 filas de células germinales redondas llamadas espermatogonias que también descansan sobre la membrana basal, constituyen la mayor parte del túbulo seminífero, se distribuyen en forma ordenada y se van diferenciando hacia la luz del túbulo (Kerr *et al* 2006, Tresguerres *et al* 2010).

Las células de Sertoli producen otra serie de sustancias cuya afinidad es variable y que incluye al factor de crecimiento seminífero (SGF, por sus siglas en inglés) que es una proteína que estimula la proliferación de las propias células de Sertoli de forma autocrina. Otro producto es el factor de células madre (SCF, por sus siglas en inglés) que se une al producto del protooncogén c-kit presente en las membranas de las espermatogonias. El c-kit estimula la división de las espermatogonias antes de entrar en meiosis y también participa en la diferenciación de las células de Sertoli (Griswold y McLean 2006, Kerr *et al* 2006, Tresguerres *et al* 2010).

La espermatogénesis es el conjunto de transformaciones citológicas que sufren las espermatogonias para convertirse en espermatozoides, está formada por tres fases. La primera fase (replicación de la célula germinal) consiste en una proliferación por mitosis de las espermatogonias para mantener completo su ADN, es generalmente una citocinesis incompleta, formando espermatocitos primarios unidos por puentes intercelulares. En la segunda fase, en respuesta a señales desconocidas los espermatocitos primarios inician la primera meiosis, en donde las células presentan una serie de cambios nucleares característicos que dan lugar a células más pequeñas con número cromosómico haploide denominadas espermatocitos secundarios. Éstos entran en la segunda división meiótica y se transforman en espermátides cerca de la luz de túbulo. Durante la tercera fase no hay divisiones celulares, pero cada espermátide tiene un proceso de metamorfosis y maduración denominada espermiogénesis en la cual se transforma una célula convencional en una altamente especializada con capacidad de movimiento derivada del flagelo (Figura 8) (Alberts *et al* 2002, Tresguerres *et al* 2010, <http://www.biologiaescolar.com/2014/06/gametogenesis.html>).

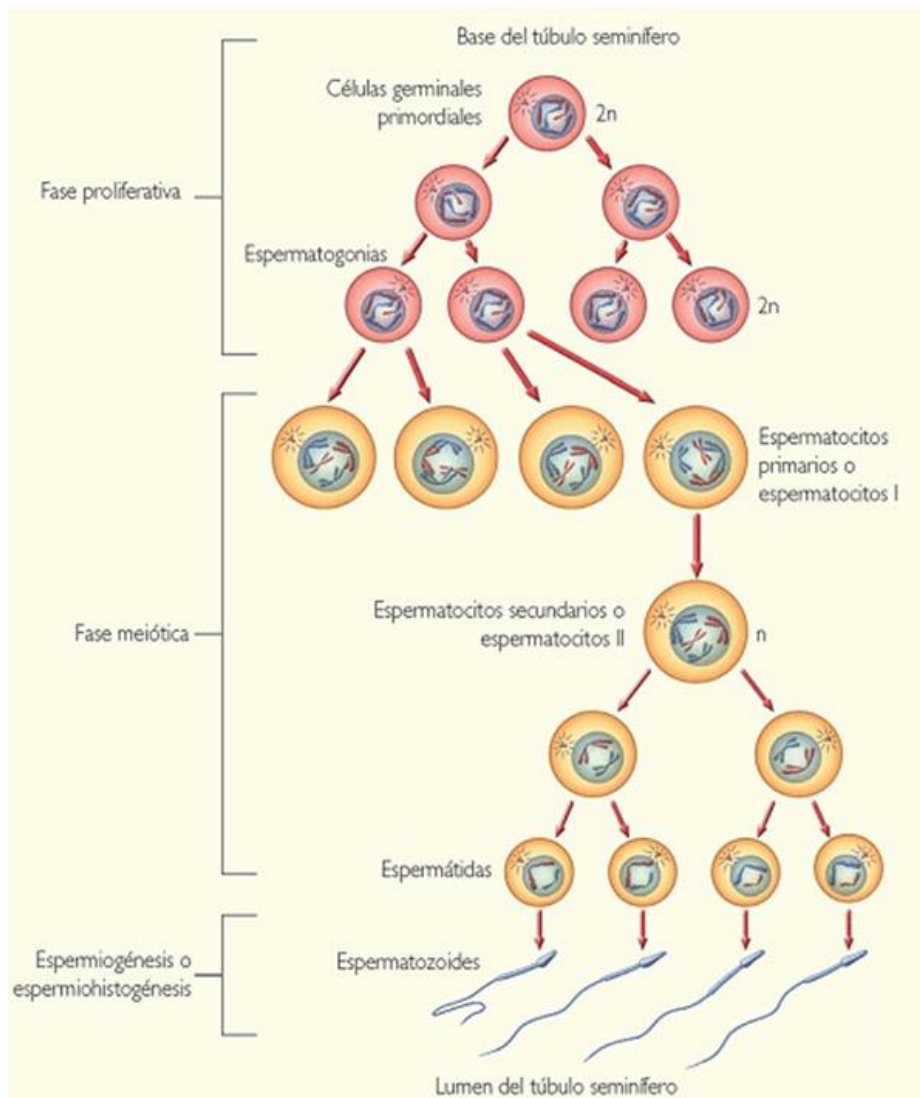


Figura 8. Fases de la espermatogénesis (tomado de <http://www.biologiaescolar.com/2014/06/gametogenesis.html>).

La espermiogénesis involucra cambios de tipo nuclear (migración desde el centro de la célula hasta una posición periférica), formación del acrosoma, desarrollo del flagelo, redistribución del citoplasma asociada a la localización excéntrica del núcleo y espermiación (vertido del espermatozoide formado en la luz del túbulo), liberándose un resto citoplásmico denominado cuerpo residual, que queda dentro de las células de Sertoli (Figura 9) (Tresguerres *et al* 2010, http://dijbio.blogspot.mx/2014/02/analisis-de-muestra-de-espermatozoides_22.html).

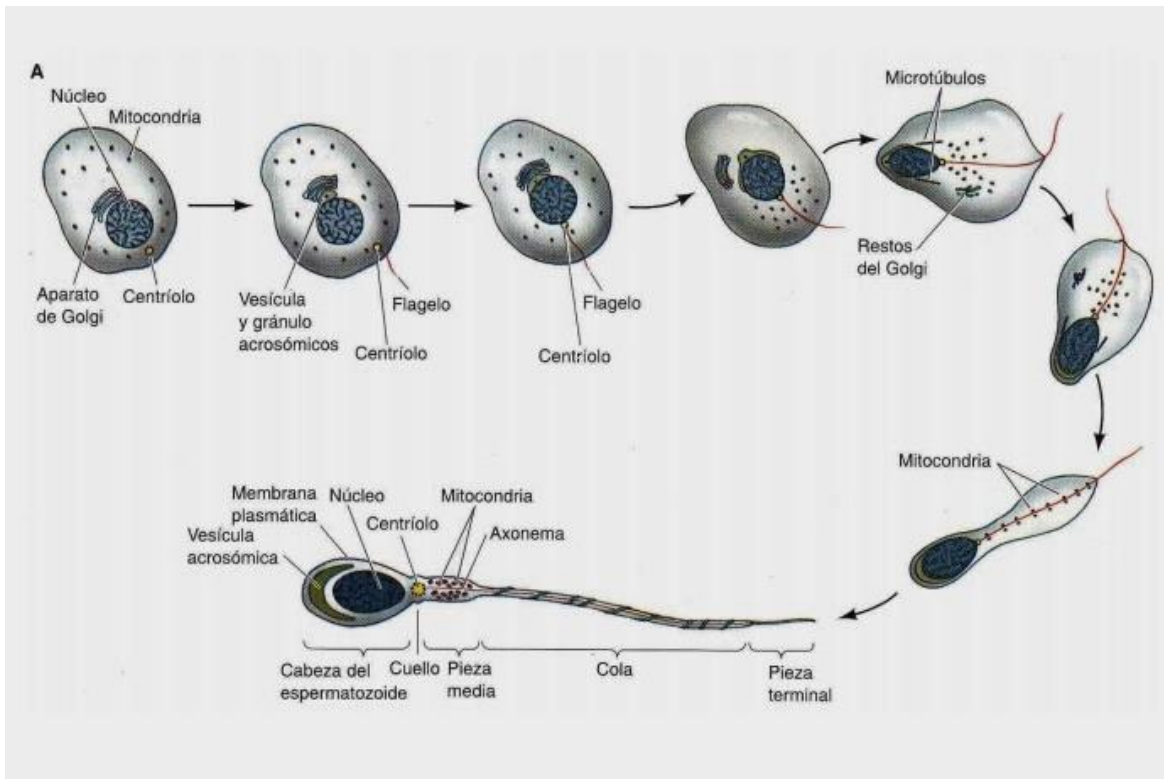


Figura 9. Etapas de la espermiogénesis (tomado de http://dijbio.blogspot.mx/2014/02/analisis-de-muestra-de-espermatozoides_22.html).

La espermatogénesis en el hombre inicia en la pubertad y se mantiene durante toda la vida. El proceso completo dura entre 74 y 75 días y las células del epitelio germinal proliferan de manera constante a lo largo de la vida del hombre adulto, ya que se requiere un continuo aporte de células germinales precursoras. Al principio de cada ciclo espermatogénico se produce una línea celular adicional, que permanece inactiva o latente hasta el ciclo siguiente, en la cual la espermatogonia tipo A da lugar al tipo B y después inicia su transformación a espermatozoide maduro. Esta espermatogonia al dividirse da lugar a una nueva generación tanto de líneas celulares como de espermatogonias A, repitiéndose otra vez el proceso (Kerr *et al* 2006).

Los espermatozoides son transportados de los túbulos seminíferos a conductos eferentes denominados *rete testis* conectados con el epidídimo, el cual es un sitio donde se maduran y almacenan los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación. El epidídimo se adhiere al lado posterior de los testículos. Contiene un solo conducto enrollado, de 6 m de largo, incrustado en tejido conjuntivo. Este conducto reabsorbe aproximadamente el 90% del líquido secretado por los testículos. Los espermatozoides son inmaduros desde el punto de vista fisiológico cuando dejan los testículos y van

madurando a medida que viajan por la cabeza y cuerpo del epidídimo. En 20 días alcanzan la cola y se almacenan allí y en la parte adyacente del conducto deferente. Los espermatozoides almacenados siguen siendo fértiles de 40 a 60 días, pero si envejecen antes de ser eyaculados, el epidídimo los reabsorbe (Figura 10) (Tresguerres *et al* 2010, Saladin 2013, <http://www.fertilita4us.org/come-siamo-fatti/uomo/fisiologia-maschile.html>).

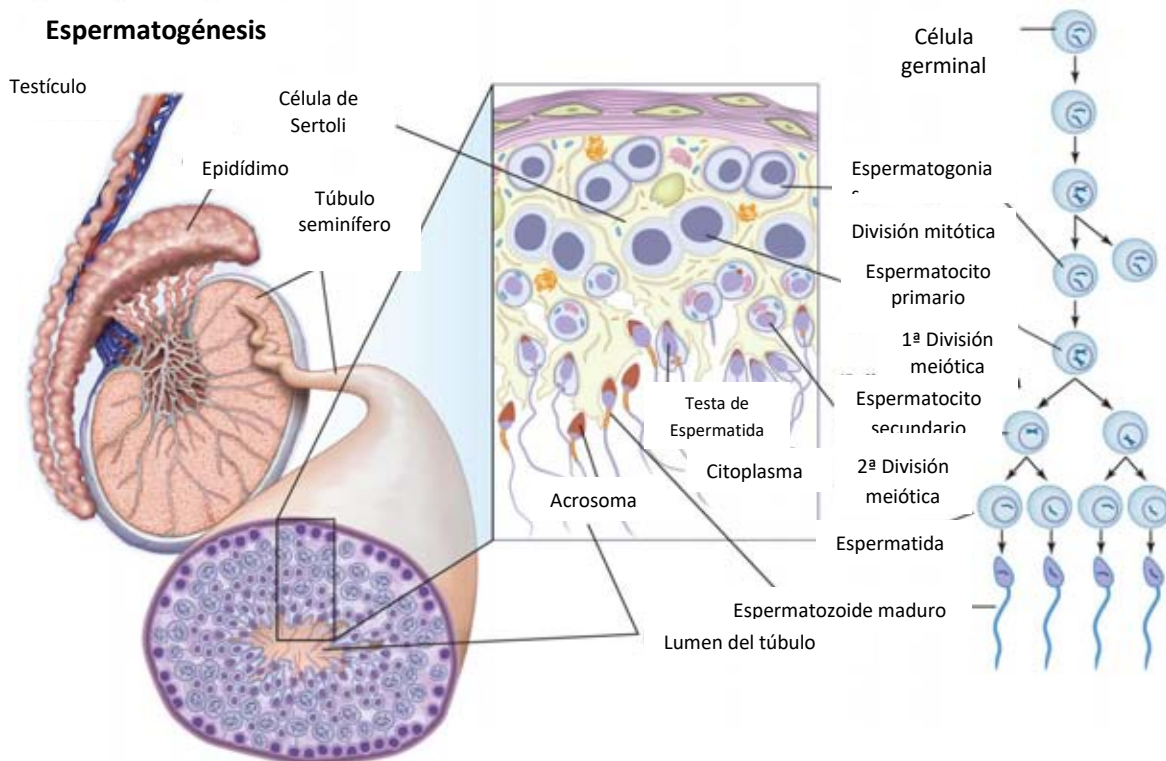


Figura 10. Espermatogénesis (tomado y modificado de <http://www.fertilita4us.org/come-siamo-fatti/uomo/fisiologia-maschile.html>).

4. Eje hipotálamo - hipófisis - testículo

El hipotálamo que es la porción más inferior del diencefalo. Localizado por debajo del tálamo, forma el piso y parte de las paredes laterales del tercer ventrículo. Regula las funciones primitivas del cuerpo, entre ellas están el equilibrio hídrico, la termorregulación, el impulso sexual y el parto. En muchas de sus funciones interviene la hipófisis, muy relacionada con el hipotálamo en los sentidos anatómico y fisiológico (Saladin 2013, Fox 2014).

La hipófisis está suspendida del piso del hipotálamo por un tallo (infundíbulo) y se alberga en una depresión del esfenoideas, la silla turca. Está compuesta por dos estructuras (la

adenohipófisis y la neurohipófisis) con orígenes independientes y funciones separadas (Saladin 2013).

La adenohipófisis constituye las tres cuartas partes anteriores de la hipófisis y se divide en dos, un lóbulo anterior grande y la parte tuberal. La adenohipófisis no tiene conexión nerviosa con el hipotálamo, sino que está vinculada con él mediante un complejo de vasos sanguíneos a los que se les denomina sistema porta-hipotálamo-hipofisario. Este sistema consta de una red de capilares primarios en el hipotálamo, un grupo de pequeñas venas a las que se les denomina vénulas portales, las cuales viajan hacia abajo por el tallo, y un complejo de capilares secundarios en la adenohipófisis. El hipotálamo controla a la adenohipófisis mediante la secreción de hormonas que entran a los capilares primarios, recorren hacia abajo las vénulas portales y se difunden por los capilares secundarios en el tejido hipofisario (Figura 11) (Hall y Guyton 2011, Saladin 2013).

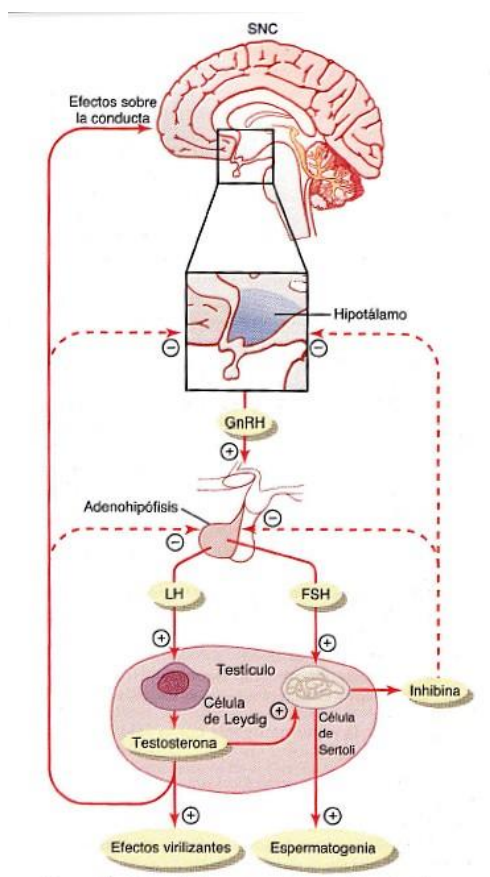


Figura 11. Regulación por retroalimentación del eje hipotálamo-hipofisario-testicular del varón. Los efectos estimulantes se representan con (+) y los efectos inhibitorios se representan con (-) (tomado de Hall 2011).

El hipotálamo recibe las señales del propio sistema nervioso central y los testículos para regular la síntesis y liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). La GnRH viaja por el sistema porta-hipotálamo-hipofisario hasta llegar a los gonadotropos ubicados en la hipófisis anterior, donde estimula la producción de la hormona luteinizante (LH) y de la FSH. Ambas gonadotropinas controlan la función de los testículos, ya que la producción de espermatozoides depende de la FSH y de la testosterona secretada por las células de Leydig en respuesta a la estimulación con LH (Stocco y McPhaul 2006).

La FSH genera la producción de sustancias importantes como ABP e inhibina y la LH participa en la producción de testosterona, sustancias importantes en la regulación del proceso de espermatogénesis, ya que participan en la proliferación y maduración de los espermatozoides (Tresguerres *et al* 2010).

Los mecanismos fundamentales de regulación entre las gonadotropinas y los productos de secreción testicular siguen el principio de la retroalimentación negativa. Al bajar las concentraciones de testosterona disminuye su efecto inhibitorio en el hipotálamo y aumenta la secreción de KISS peptinas (estimulan la secreción de gonadotropinas por activación de su receptor en neuronas GnRH hipotalámicas) que estimulan a la GnRH que a su vez estimula a los gonadotropos. El incremento de LH provoca aumento de las concentraciones de testosterona, la que a su vez reduce la frecuencia de pulsos de GnRH, modulando el sistema opiáceo y disminuyendo las KISS peptinas (Tresguerres *et al* 2010).

La secreción de FSH adenohipofisaria se regula fundamentalmente por el sistema inhibina/activina que tiene una acción selectiva a nivel hipofisario: la primera disminuye las concentraciones de FSH tanto basal como estimulada por GnRH y la segunda ejerce un efecto contrario; sin modificar las concentraciones de LH (Tresguerres *et al* 2010).

5. Espermatozoide

El espermatozoide humano mide de 45 a 60 μm de longitud y se desplaza a una velocidad promedio de 75 μm por segundo. Los espermatozoides son células especializadas que estructuralmente se pueden dividir en la cabeza, que posee las estructuras requeridas para la fecundación, y el flagelo, que aporta la energía para la movilidad. Desde el punto de vista morfológico, el espermatozoide tiene cuatro partes:

- La cabeza, que es donde se encuentra el núcleo que contiene el ADN condensado y el acrosoma denso en el margen anterior, mide 4.5 μm de largo por 3 μm de ancho por 1 μm de espesor. El casquete acrosómico es una cobertura de la cabeza a manera de gorra que cubre los dos tercios anteriores del núcleo; es un organelo similar a un lisosoma rico en hialuronidasa, neuraminidasa, fosfatasa ácida y una proteasa similar a la tripsina llamada acrosina.
- El cuello contiene los centriolos y el origen de las fibras gruesas.
- La pieza intermedia, mide alrededor de 7 μm , contiene una gran cantidad de mitocondrias dispuestas en forma helicoidal alrededor de las fibras gruesas y del complejo axonémico, estas mitocondrias proveen energía para el movimiento de la cola y por ende son la causa de la movilidad del espermatozoide.
- El flagelo se divide en: pieza principal que mide alrededor de 40 μm de longitud, contiene la vaina fibrosa por fuera de las fibras gruesas y del complejo axonémico, y la pieza terminal, que corresponde aproximadamente a los últimos 5 μm del flagelo en el espermatozoide maduro, sólo contiene el complejo axonémico. Además, el flagelo contiene proteínas motoras como la dineína (Velázquez 2009, Arenas *et al* 2010, Cerezo *et al* 2014, Sedglach 2014).

Los espermatozoides en el túbulo seminífero carecen de movimiento, por lo que son generalmente incapaces de fecundar. En su recorrido por la rete testis, conducto eferente, epidídimo y conducto deferente, se nutren con las secreciones del epitelio de estas estructuras, dependientes de testosterona. Por tanto, esta hormona está implicada en la espermatogénesis mediante la acción trófica sobre el líquido seminal que sirve de vehículo y aporta los elementos nutritivos necesarios para la maduración y el metabolismo de los espermatozoides que, al carecer de citoplasma, necesitan de estas sustancias para su supervivencia y movilidad. Esta última función y la capacidad fecundante las adquieren durante su recorrido por el epidídimo, que dura aproximadamente dos horas (Figura 12) (Olivera *et al* 2006, Tresguerres *et al* 2010).

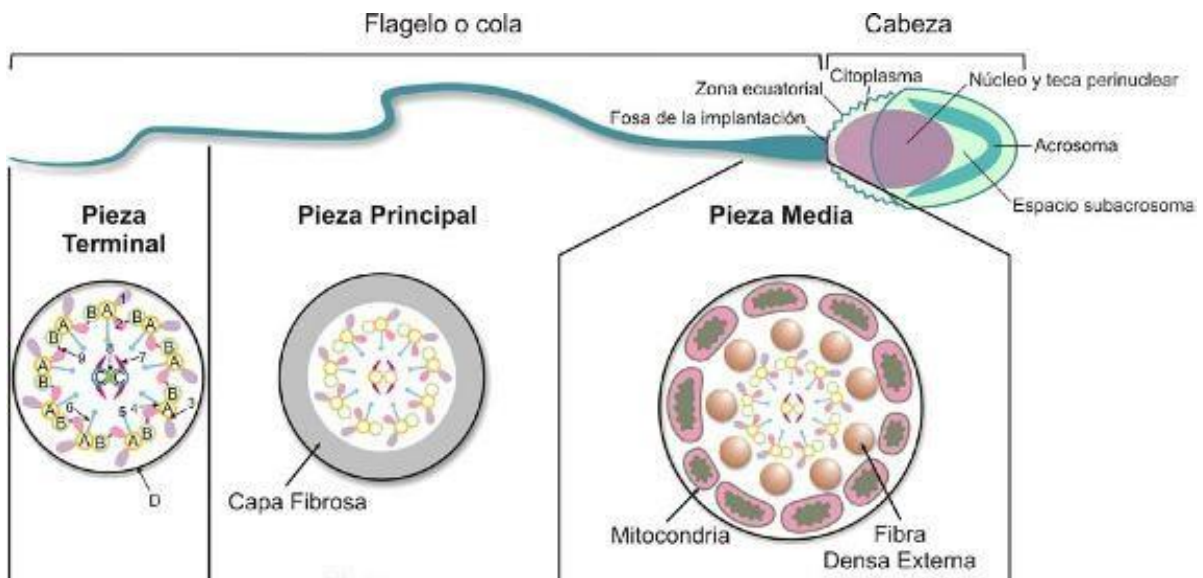


Figura 12. Partes del espermatozoide (tomado y modificado de Olivera *et al* 2006).

6. Eyaculación

La eyaculación es la expulsión del semen por la uretra hasta el exterior. Este proceso lo inician centros reflejos en la médula espinal que estimulan la contracción del músculo liso en la próstata, generando la contracción del músculo esquelético en el piso pélvico que proporciona la fuerza necesaria para la expulsión. Durante la eyaculación, el esfínter involuntario en la base de la vejiga se cierra para evitar la liberación de orina (Cohen y Taylor 2009).

El semen es un líquido pegajoso con apariencia lechosa. El pH está en el rango alcalino de 7.2 a 7.8. Las secreciones componen el semen tienen varias funciones: nutren y transportan a los espermatozoides, neutralizan la acidez de la uretra masculina y las vías vaginales femeninas, lubrican las vías reproductivas durante el coito y previenen infecciones con enzimas antibacterianas y anticuerpos. El eyaculado de un varón es ≥ 1.5 mL de semen y puede contener más de 50 millones de espermatozoides por mL, sin embargo, sólo uno puede fertilizar al óvulo; el resto de las células viven hasta tres días (Cohen y Taylor 2009, Cerezo *et al* 2014).

Durante la eyaculación se pueden distinguir cuatro fracciones del eyaculado:

- Fracción pre-eyaculatoria: Es de consistencia mucosa, transparente y presenta pocos espermatozoides. Procede de la glándula de Cowper y su función consiste en limpiar y hacer más resbaladizo el canal de la uretra.

- Fracción previa: Es fluida y no presenta espermatozoides ya que tiene un pH ácido, esto debido a su elevada concentración de fosfatasa ácida y ácido cítrico; procede de la próstata.
- Fracción principal: Presenta elementos líquidos y gelatinosos, procede del epidídimo y conductos deferentes, es la fracción que contiene la mayor cantidad de los espermatozoides.
- Fracción terminal: De consistencia gelatinosa; procede de las vesículas seminales, tiene un pH alcalino y contiene fructosa, razón por la cual todavía tiene espermatozoides presentes (Kumar *et al* 2011, Cerezo *et al* 2014).

7. Infertilidad

La infertilidad es la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales sin protección. La prevalencia de los casos de infertilidad ha aumentado en los últimos años. Se ha constatado que el índice de fertilidad en la mujer es alrededor de los 25 años y disminuye en forma brusca a los 35, y se considera que a los 40 años la tasa de infertilidad estaría entre el 65 y 70%. La frecuencia de parejas infértiles a nivel mundial se sitúa entre el 10 y 15%. El factor masculino está involucrado el 35% de los casos, el factor femenino el 35%, el 15% a ambos y el 15% se debe a causas desconocidas. Estas cifras determinan que la evaluación del varón es esencial y se debe realizar al inicio de todo estudio de fertilidad (WHO 2010, Acosta y Dueñas 2014).

Los mecanismos que alteran la fertilidad masculina son anomalías en los espermatozoides, trastornos hormonales por alteraciones en el hipotálamo o hipófisis, trastornos vasculares, procesos infecciosos, traumas testiculares, criptorquidia, disfunción eréctil, eyaculación retrograda, obstrucción de los conductos eyaculadores, deformaciones en el pene, factores inmunológicos, factores neuronales, ambientales, cáncer, medicamentos, la esterilidad quirúrgica como resultado de una vasectomía, entre otros (Rosas 2007, Raheem y Ralph 2011).

La infertilidad se diagnostica mediante estudios andrológicos que se llevan a cabo en clínicas especializadas, ya que las características que debe cumplir una muestra de espermatozoides para conseguir una fecundación están bien establecidas. En consecuencia, se tiene que asumir que las causas de la esterilidad masculina son

múltiples y no hay una solución definitiva que resuelva el problema (Gonsálvez *et al* 2009).

8. Análisis seminal

El análisis de semen es la herramienta diagnóstica básica más importante en el estudio de fertilidad masculina y que nos brinda una visión más amplia sobre la calidad reproductiva del varón, misma que es evaluada según los valores publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el 2010 publicó la actualización de los parámetros macroscópicos y microscópicos para poder determinar la calidad seminal de un individuo, indicando en las pruebas macroscópicas que para una muestra seminal normal el volumen mínimo es de 1.5 mL, licuefacción (líquido homogéneo) en un rango de 30 a 60 min, viscosidad, color gris opalescente, sin grumos y con un pH de 7.2 a 7.8. En las pruebas microscópicas se debe tener movilidad espermática \geq al 40%, vitalidad \geq al 58%, concentración \geq a 15 millones de espermatozoides por mL y morfología normal \geq al 4%. En el Cuadro I se muestran los valores actuales y anteriores de evaluación seminal (WHO 2010, Cerezo *et al* 2014).

Se estima que aproximadamente del 10 al 15% de los varones infértiles presentan parámetros dentro de los rangos normales. En la actualidad los parámetros obtenidos en un seminograma convencional no aportan información completa sobre el potencial fecundante del espermatozoide, la capacidad de dar lugar a un embrión sano y un embarazo exitoso. Un estudio a fondo requiere analizar también el ADN espermático (Morales *et al* 2007).

Cuadro I. Parámetros seminales de la OMS de 1999 y 2010.		
	1999	2010
Volumen	≥ 2.0	≥ 1.5
Concentración (10^6 mL^{-1})	≥ 20	≥ 15
Movilidad (%)	≥ 50 (a+b)	≥ 40
Movilidad progresiva (%)	> 30	≥ 32
Morfología (% normal)	> 30	≥ 4
Viabilidad (% vivos)	> 50	≥ 58
Leucocitos (10^6)	< 1	< 1

9. Reproducción asistida

Las técnicas de reproducción asistida humana (TRAH) surgen con el objetivo principal de conseguir un embarazo viable. Son tecnologías que están en constante cambio y no existe acuerdo sobre los criterios diagnósticos o terapéuticos disponibles (Jausoro 2000). A continuación, se mencionan algunos de los procedimientos más recurridos en las TRAH.

Estimulación ovárica controlada (EOC)

Se realiza buscando el desarrollo de varios folículos ováricos mediante la administración preferentemente de gonadotropinas controlando la foliculogénesis mediante ecografía transvaginal. Es importante un control estricto de las dosis y un seguimiento adecuado, ya que dosis excesivas pueden producir síndrome de hiperestimulación ovárica o embarazo múltiple (Sedglach 2014).

Inseminación intrauterina

Es una TRAH que consiste en depositar espermatozoides de una forma no natural en la cavidad uterina en su periodo ovulatorio. Puede ser homóloga (donante) o heteróloga (conyugal). Sus indicaciones son oligoastenoteratozoospermia con menos de 5 millones de espermatozoides móviles progresivos post-capacitación, con teratozoospermia menos del 4 %; incapacidad para depositar el semen en la vagina, factor cervical y endometriosis mínima (Sedglach 2014).

Fertilización *in vitro*

Consiste en la fecundación de un ovocito en condiciones de cultivo *in vitro*, previa a la obtención por aspiración guiada por ultrasonido y preparación de los gametos, para posteriormente transferir los embriones a la cavidad uterina (Sedglach 2014).

La fertilización *in vitro* está indicada principalmente cuando el método ofrece la forma de superar uno o más obstáculos específicos que no pueden tratarse de otra forma. Las indicaciones para realizar fertilización *in vitro* son: por factor masculino (muestra insuficiente para inseminación artificial, recuento de espermatozoides menor a 5 millones), infertilidad de origen desconocido, falla ovárica y disminución de reserva ovárica, alta repuesta en el ciclo de inseminación artificial, criopreservación de ovocitos en pacientes oncológicas o patología médica, preservación de la fertilidad (Sedglach 2014).

Inyección espermática intracitoplasmática (ICSI)

Consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado y orientado. Las indicaciones de la inyección espermática intracitoplasmática son: disminución del número de espermatozoides, baja movilidad, menos de 3 millones de espermatozoides móviles progresivos, teratozoospermia severa, anticuerpos antiespermatozoides, paciente con cáncer (semen valioso), alteraciones en la eyaculación (eyaculación retrograda), ausencia de conductos deferentes, síndrome de Young, vasoepididimostomía fallida, vasovasostomía fallida, obstrucción de ambos deferentes, fallo de recuperación en epidídimo por fibrosis, necrozoospermia, mala calidad ovocitaria, congelación y descongelación de ovocitos (Sedglach 2014).

10. Banco de semen

El banco de semen es un servicio integrado en determinados centros de reproducción asistida que permite la criopreservación de muestras de semen y biopsias testicular para su utilización futura. Este servicio puede ocuparse también del almacenamiento y gestión de muestras de semen proporcionadas por donantes, que se destinan a donación anónima a parejas o mujeres que lo necesitan (Remohí *et al* 2008).

El trabajo de un banco de semen comprende desde aspectos científicos, como podrían ser los procedimientos de congelación de las muestras, su mantenimiento y su descongelación, hasta aspectos meramente administrativos, como la correcta identificación, trazabilidad y ubicación de las muestras, los registros necesarios, la gestión de altas y bajas, en el caso de los donantes de semen, el control sobre el análisis que por ley debe realizarse (Remohí *et al* 2008, <http://generalidadesdelaganaderia.bovina.blogspot.mx/2015/05/tanque-de-nitrogeno-liquido.html>).

En la actualidad son muchos los varones que, por múltiples razones, necesitan de estos servicios. El banco de semen permite, además, el transporte de muestras a otras zonas geográficas (muestras valiosas, como las obtenidas antes de tratamientos de quimioterapia, o biopsias) y mejora el aprovechamiento del eyaculado, ya que al congelarse las muestras en píldoras, un sólo eyaculado o biopsia puede usarse en diferentes ocasiones (Remohí *et al* 2008).

Indicaciones para el uso del banco de semen, como almacén de muestras propias

El banco de semen ofrece la posibilidad de guardar muestras congeladas y asegurar así la posibilidad de engendrar en caso de pérdida previsible o imprevisible de la fertilidad del varón (Remohí *et al* 2008).

Los casos más frecuentes son los siguientes:

- Pacientes en edad reproductiva y sin hijos a los que se les ha diagnosticado cáncer y por ello van a recibir diferentes tratamientos quirúrgicos, quimioterapia o radioterapia, que pueden provocarles esterilidad transitoria o definitiva.
- Pacientes sometidos a tratamientos farmacológicos con efecto teratogénico (tratamientos como el interferón en la hepatitis C).
- Pacientes sometidos a vasectomías para garantizar sus posibilidades reproductivas en caso de que cambien de opinión.
- Profesionales de riesgo o pacientes que congelen semen como medida preventiva sin otro motivo (son los casos menos frecuentes).
- Pacientes cuyas muestras son difíciles de obtener, como ocurre con las biopsias testiculares, las muestras de semen lavado por VIH o VHC, etc.
- Pacientes con dificultades para eyacular debido a impotencia, eyaculación retrograda, mal formaciones congénitas, etc.
- Pacientes que por diferentes razones es difícil que estén presentes en el momento en que se va a utilizar la muestra (Remohí *et al* 2008).

El banco de semen de donantes

Otro aspecto que se debe considerar es el semen de donante anónimo. Este semen puede estar destinado a mujeres sin pareja, parejas en las que el varón presenta una patología seminal grave, a parejas en las que las técnicas de reproducción asistida han fracasado repetidamente, cuando el varón es O positivo para el VIH, o portadores de alteraciones genéticas todavía no tratables mediante el diagnóstico pre-implantacional (Remohí *et al* 2008).

Al congelar las muestras de semen, la intención es evitar el periodo de ventana de enfermedades infecciosas como VIH, sífilis y hepatitis, que son detectados en suero seis meses después del contacto con la enfermedad gracias a la presencia de anticuerpos como respuesta al virus. Es por ello que las muestras de donante deben almacenarse durante ese periodo antes de realizar la comprobación serológica y así poder utilizar las muestras con seguridad (Espinosa 2009).

11. Criopreservación

Se ha estudiado ampliamente el proceso de congelación del material biológico, ya que depende del tipo celular y de variables como la permeabilidad celular, el volumen osmóticamente inactivo, la relación entre la superficie y el área celular donde se ve afectado el material biológico a congelar; por ejemplo, en los espermatozoides, aunque se utilicen los mejores avances en la congelación, del 25 al 75% mueren o tienen daños irreversibles provocados por la congelación (Esteves *et al* 2003, Ávila *et al* 2006).

Las células criopreservadas se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido. A esta temperatura no existen fenómenos ni de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo reacciones químicas. Por tanto, las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a bajas temperaturas sino de los procesos de enfriamiento y calentamiento (Figura 13) (Fernández *et al* 2009).



Figura 13. Tanque de nitrógeno líquido (tomada de <http://generalidadesdelaganaderiabovina.blogspot.mx/2015/05/tanque-denitrogeno-liquido.html>).

Durante estos procesos las células se encuentran en suspensión en una solución acuosa. Dicha solución tendrá unas propiedades coligativas que dependen fundamentalmente del número de moléculas que hay en ella y no de la naturaleza de estas. Así, al añadir un soluto a una disolución disminuye el punto de congelación (punto crioscópico) y la presión de vapor; aumentando la presión osmótica y el punto de ebullición (Fernández *et al* 2009).

Estas propiedades se debe tener presentes cuando al disminuir la temperatura durante el proceso de congelación, se empieza a formar hielo en el medio extracelular, ya que el agua que forma parte del hielo no contiene los solutos que tenía disueltos, aumentando la concentración de estos en el medio extracelular (hiperosmótico) y modificando las propiedades coligativas de este (Fernández *et al* 2009).

Permeabilidad

La permeabilidad está relacionada con la capacidad de la membrana para intercambiar agua con el medio exterior. Este parámetro define la facilidad con la que el agua puede atravesar la membrana ante un gradiente de concentraciones. La permeabilidad de la membrana celular está regulada por una ley que refleja el hecho empírico de que cuanto menor es la temperatura del sistema, menor es la permeabilidad de la membrana (Fernández *et al* 2009).

Volumen osmóticamente inactivo

En esta región incluimos orgánulos internos de la célula, el núcleo celular, macromoléculas como por ejemplo proteínas, etc. Son partes internas de la célula que no van a intervenir en el proceso del transporte del agua. Se define como el agua que nunca dejara el interior celular en respuesta a un aumento de concentración de solutos (Fernández *et al* 2009).

Volumen osmóticamente activo

En esta región incluimos la solución intracelular en la que están flotando los orgánulos internos, el núcleo, etc., que si puede abandonar la célula.

Respuesta celular a la congelación por choque frío y daño de enfriamiento (desde 37 °C A 0 °C)

El choque por frío es el daño celular debido a la sensibilidad frente a la velocidad de enfriamiento, y es causada por efectos de transición en la fase lipídica. El daño por

enfriamiento es provocado por la sensibilidad frente a una temperatura específica o un rango de temperaturas (Drobnis *et al* 1993).

Los ácidos grasos pueden existir en un estado rígido ordenado (gel) o en uno más flexible y relativamente desordenado (fluido). La transición de un estado al otro se da en un rango de temperaturas, la media de la cual se conoce como temperatura de transición de fase (“melting temperature”, T_m). La mayoría de las membranas de células eucariotas tienen su T_m entre los 0 °C y los 20 °C (Fernández *et al* 2009).

Formación de hielo (0 °C a \leq - 132 °C)

La respuesta de las células descongeladas, depende del método de enfriamiento. En particular la velocidad de enfriamiento es el parámetro crítico que determina los resultados del protocolo de criopreservación.

La existencia de solutos en el agua produce un descenso del punto de congelación (punto crioscópico entre -5 °C y -10 °C) y en consecuencia la cristalización del agua se produce a temperaturas menores a la del punto de congelación del agua pura (0 °C). Esto produce, al disminuir la temperatura, un sobre-enfriamiento de la muestra. En esta situación el comienzo del proceso de formación de hielo es de naturaleza aleatoria, y depende de la probabilidad de formación del punto de nucleación, punto de inicio de un frente de cristales de hielo que es inversamente proporcional a la temperatura. Cuanto mayor sea la diferencia entre la temperatura a la que comienza a formarse hielo y la temperatura de cambio de fase, mayor será la velocidad de crecimiento de los cristales de hielo. En el peor de los casos, puede ocurrir que la temperatura a la que comienza a formarse hielo sea tan baja, que la velocidad de crecimiento de los cristales resulta explosiva. En estas condiciones los cristales de hielo actúan como lanzas que atraviesan las células, destruyéndolas por completo (Mazur 1977, Fernández *et al* 2009).

Descongelación

Durante la descongelación se reproducen los cambios osmóticos inversos a los descritos en la congelación. Así, cuando el agua congelada cambia de estado (sólido a líquido), la concentración de solutos en el medio extracelular se reduce progresivamente y la célula vuelve a hidratarse para compensar esta diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior celular. Generalmente se considera que para la recuperación de las células son necesarias tasas de recalentamiento rápidas. Esto se ha atribuido a la posibilidad de que pequeños cristales de hielo intracelular formados en algunas células durante la

congelación podrían crecer durante un proceso lento de recalentamiento (Fernández *et al* 2009).

Observaciones experimentales revelan que al criopreservar muestras a altas o bajas velocidades, provocan que la supervivencia de las células disminuya. Cuando la supervivencia celular se dibuja en función de la velocidad de enfriamiento, el resultado produce una curva característica con “forma de U invertida” (Figura 14) (Fernández *et al* 2009).

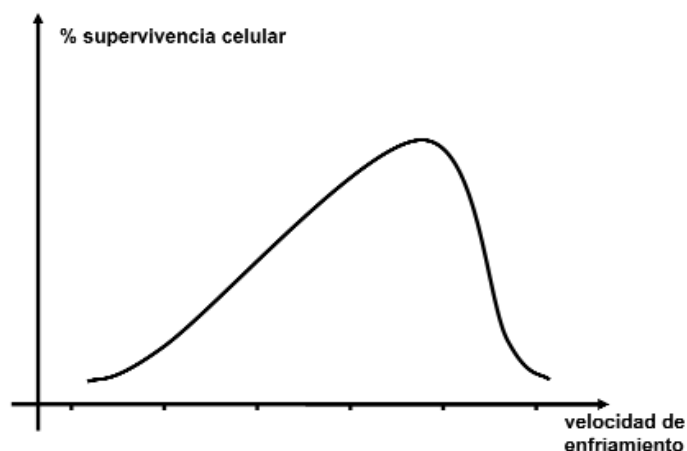


Figura 14. Curva que muestra la supervivencia celular en función de la velocidad de enfriamiento (tomada de Fernández *et al* 2009).

Formación de hielo intracelular

A partir de que se inicia la nucleación extracelular y la correspondiente deshidratación celular, lo que suceda en el espacio intracelular depende básicamente de la velocidad de enfriamiento. Si ésta es demasiado rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación intracelular, el agua remanente se congela formando hielo intracelular (Mazur 1963, Nei *et al* 1978).

Todos los materiales biológicos deben almacenarse por debajo de la temperatura de transición de fase del agua a estado vítreo (aproximadamente $-132\text{ }^{\circ}\text{C}$) para poner fin a toda actividad biológica. A temperaturas superiores a $-132\text{ }^{\circ}\text{C}$ se reduce la longevidad celular a cuestión de semanas o meses, pues aún puede existir agua líquida y por lo tanto actividad celular. La transición a estado vítreo de una solución acuosa congelada no ocurre repentinamente en $-132\text{ }^{\circ}\text{C}$; sino que es un fenómeno progresivo entre -132 y $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. En una célula congelada a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ que pasa a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, algunas moléculas de agua

vuelven a estado líquido que pueden convertirse en cristales que provocan pequeños daños de re-cristalización. El problema es que estos daños son acumulativos; y cada incidente de calentamiento que se produzca por encima de $-132\text{ }^{\circ}\text{C}$ (el sacar un canister del nitrógeno líquido para extraer otra pajueta) contribuirá a disminuir la supervivencia funcional de las células criopreservadas (Fernández *et al* 2009).

El choque térmico puede ser mitigado por agentes crioprotectores, la presencia de fosfolípidos (fosfatidilserina), una congelación lenta y pre-acondicionamiento en un medio con un nivel elevado de sales (Fernández *et al* 2009).

Agentes crioprotectores

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento fisicoquímico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación, para ello se añaden al medio de congelación los agentes crioprotectores (ACP). Los ACP son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución determinada (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido). El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que en el momento en el que se induce la nucleación en el espacio extracelular la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congela (Fernández *et al* 2009).

ACP penetrantes

Los ACP penetrantes son sustancias de bajo peso molecular y son permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Los más utilizados son el 1,2-propanodiol (PROH), dimetilsulfóxido (DMSO), etilen-Glicol (EG) y glicerol. Todos estos compuestos tienen en común que sus moléculas son pequeñas, es decir, tienen un peso molecular relativamente bajo; así el glicerol tiene 92.09 g/mol de peso molecular, lo que le permite atravesar la membrana celular. Si bien la célula es permeable a estos agentes su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que la del agua. Dentro de este grupo el glicerol es el más usado en la criopreservación espermática (Fernández *et al* 2009).

ACP no penetrantes

Son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. El tamaño de estas moléculas es muy superior a las del grupo anterior, como, por ejemplo, el peso molecular de la sacarosa es 342. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran la célula, sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son la sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinilpirrolidona (PVP), dextrano y polietilén-glicol (PEG); donde, en congelación de semen humano las más usados son los dos primeros (Fernández *et al* 2009).

Aspectos perjudiciales de los ACP

A pesar de los efectos beneficiosos de los agentes crioprotectores, también son dañinos, especialmente cuando son empleados en altas concentraciones. Los principales efectos dañinos son los siguientes:

- **Toxicidad:** Los ACP son sustancias químicas que en condiciones normales no se encuentran en el interior de las células. Por ello, cuando atraviesan la membrana celular y se difunden por el medio intracelular, lo que realmente está sucediendo es envenenar a la célula. Sin embargo, como el metabolismo celular está ralentizado, la acción tóxica de los crioprotectores se ve muy disminuida, salvo que empleen altas concentraciones (Fuller *et al* 2004, Fernández *et al* 2009).
- **Osmosis:** La adición de ACP ejerce *per se* un estrés osmótico sobre las células porque aumentan la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP y después se hidratan a la vez que el agua vuelve al interior celular junto con el ACP (permeable) (Fernández *et al* 2009).
- **Cambios en la permeabilidad al agua de la membrana plasmática del espermatozoide:** diferentes ACP reducen la permeabilidad al agua en diversos grados, y así los espermatozoides se deshidratan más lentamente de lo esperado (Fernández *et al* 2009).

12. ADN

Una cadena de ADN es un largo polímero no ramificado, compuesto únicamente por cuatro tipos de subunidades. Estas subunidades son los desoxirribonucleótidos que contienen las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Los nucleótidos están unidos por enlaces covalentes fosfodiéster entre el carbono 5' de un grupo desoxirribosa y el carbono 3' del siguiente. Los cuatro tipos de bases están fijados a esta cadena de azúcar fosfato repetitiva, como cuatro tipos diferentes de cuentas ensartadas en un collar (Alberts *et al* 2002).

La molécula de ADN es un polímero helicoidal formado por dos hebras. Todas las bases de la molécula de ADN se hallan en el interior de la doble hélice, mientras que los azúcares fosfato se disponen en el exterior. Las bases de una de las hebras están extraordinariamente cerca de las de la otra hebra y hay un apareamiento complementario entre una base púrica (A o G, presentan dos anillos) de una de las cadenas y una base pirimidínica (T o C, presentan un anillo y son de menor tamaño) de la otra cadena. El apareamiento de bases complementarias se forma por A y T por un lado y entre G y C por otro (Figura 15) (Alberts *et al* 2002, <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45671>).

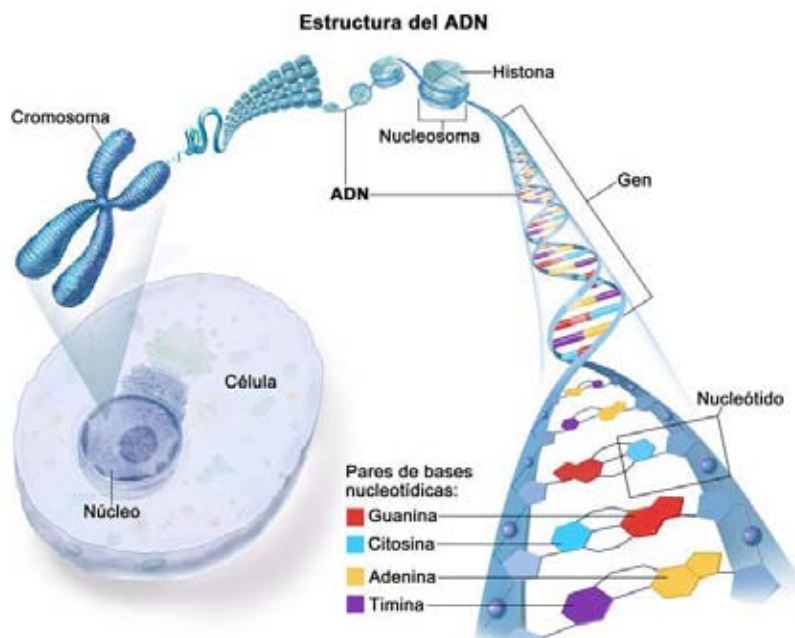


Figura 15. ADN y empaquetamiento de una célula somática (tomado de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45671>).

13. ADN espermático

La cromatina contenida en el núcleo de los espermatozoides maduros está extremadamente compacta y es una estructura estable. El ADN espermático se organiza de una manera específica a diferencia de una célula somática, para lograr este estado de compactación único. Esta organización permite que no solo se transfiera el ADN extremadamente empaquetado al ovocito, sino que también tiene una forma física y química para que el embrión pueda acceder a su información genética (Figura 16) (Sakkas *et al* 1999, Schagdarsurengin 2012).

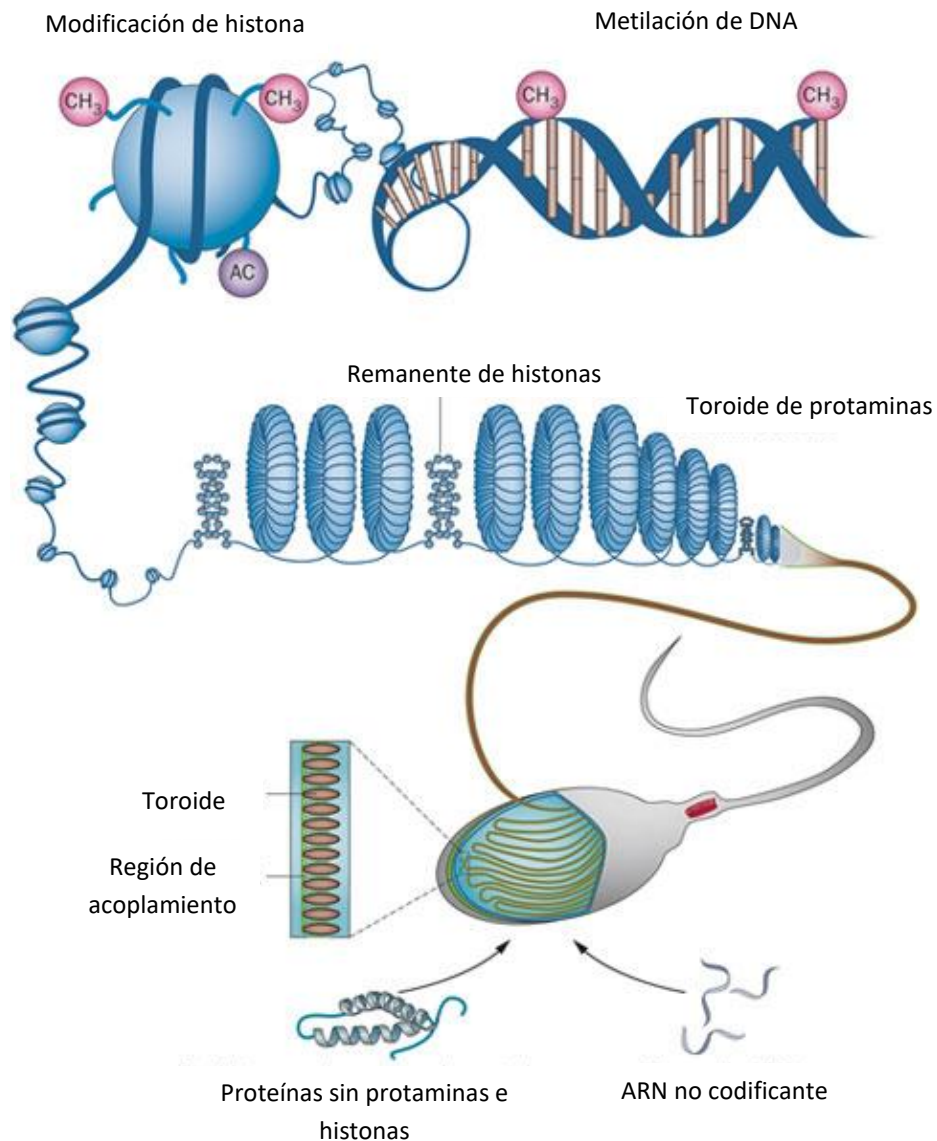


Figura 16. Modificación histona-protamina (tomada y modificada de Schagdarsurengin 2012).

Los reordenamientos complejos de la cromatina de los espermatozoides se producen durante la espermiogénesis. En las espermátidas alargadas las histonas asociadas al ADN son remplazadas por protaminas, como resultado de este proceso, la cromatina en las células espermáticas es muy condensada. En el espermatozoide humano, aproximadamente el 15% del ADN permanece asociado con histonas en una secuencia específica. Las histonas en la cromatina espermática son un subconjunto de las histonas de la cromatina somática, y forman los nucleosomas que están más estrechamente empaquetados en comparación a células 2n. La histona H1 está ausente, histona H2 toma la forma de dos variantes menores, llamadas H2A.X y H2A.Z, y las histonas H3 y H4 son acetiladas completamente. La ausencia de la histona H1 y la acetilación de las histonas, son ambas características de cromatina activa. Se piensa que las histonas en los espermatozoides podrían influir en que genes se transcriban por primera vez después de la fertilización (Gardiner *et al* 1998).

Durante la espermatogénesis, las protaminas (tienen la mitad del tamaño en comparación con las histonas) sustituyen a la mayoría de las histonas y la cromatina se enrolla en toroides. Las protaminas se van uniendo por enlaces disulfuro, reduciendo seis veces el volumen de las células espermáticas a comparación de una somática, ocurriendo en el paso a través del epidídimo. Esta densa compactación protege al ADN espermático de agentes exógenos (Figura 16), a pesar de esta protección, los niveles basales de daños en el ADN de los espermatozoides son relativamente altos en los varones, además de que durante la eyaculación son susceptibles a más daño (González *et al* 2012).

14. Fragmentación del ADN

En las muestras seminales se encuentra, con mayor o menor frecuencia, espermatozoides que presentan su ADN fragmentado. El ADN espermático se puede fragmentar desde la espermatogénesis en cualquier etapa del proceso por fenómenos multifactoriales y no delimitados en su totalidad, como por ejemplo, la generación de radicales libres de oxígeno o estrés oxidante, empaquetamiento anormal de la cromatina, deficiencias en la recombinación, apoptosis tras la salida del espermatozoide de los túbulos y causas externas por la inducción de caspasas endógenas y endonucleasas, daño inducido por quimioterapia, radioterapia, tóxicos ambientales y reducción de antioxidantes en el semen. Las células de Sertoli presentes en las paredes de los túbulos, fagocitan y limpian los residuos celulares, no obstante cabe destacar que si la incidencia del fenómeno apoptótico tiene lugar tras la espermiación, o salida del espermatozoide a la

luz de los túbulos seminíferos, podrían generarse una serie de metabolitos presentes en el líquido seminal, que no serán retirados una vez que se ha producido la eyaculación y que podrían contribuir a acelerar el proceso de degradación del ADN de otros espermatozoides. De acuerdo a lo anterior se producen metabolitos no deseados altamente reactivos, tales como enzimas celulares, enzimas procedentes del acrosoma, nucleasas y enzimas de remodelación de la cromatina. En este escenario de daños directos o indirectos sobre la molécula de ADN del espermatozoide, se ha sugerido que la descendencia podría verse afectada (Morales *et al* 2007, Gonsálvez *et al* 2009, Acosta y Dueñas 2014).

Las células somáticas presentan daño en el ADN, sin embargo, las células espermáticas tienen mayor daño, que se puede encontrar en una o ambas hebras. Las rupturas de doble hebra pueden ser perjudiciales afectando la estabilidad genómica o provocando muerte celular por no poder reparar el daño. El ADN espermático se puede reparar en el ovocito, pero si tuviera gran cantidad de rupturas de doble hebra no sería posible la reparación y sería incompatible para un embrión normal o no tendría un buen desarrollo. A continuación, se mencionan las causas que provocan la fragmentación en el ADN espermático.

Causas intrínsecas

Deficiencias de recombinación durante la espermatogénesis

Los errores durante la recombinación provocan abortos. Sobre-cruzamiento meiótico se asocia con la programación genética que induce rupturas del ADN por nucleasas específicas (González *et al* 2012).

Maduración anormal de espermátidas

Rupturas en el ADN son necesarias ya que favorecen el alivio en la tensión de torsión despojándose de histonas ayudando a su sustitución por protaminas. Actividad de nucleasas para aflojar cromatina y “pausas” por topoisomerasa II. Si estos saltos no se reparan en el recorrido por el epidídimo, generan la fragmentación (González *et al* 2012).

Protamina 1 y 2

En los humanos se remplazan aproximadamente del 85 al 95 % de las histonas por protaminas, esto por múltiples procesos. Empieza con una hiperacetilación de las

histonas, remplazándose por unas variaciones específicas testiculares de histonas, seguido de una sustitución por proteínas de transición, remplazándose por protaminas 1 y 2 (P1, P2) que deben ser expresadas en proporción 1:1 generando un apretado empaquetamiento del ADN, compactando el núcleo y suprimiendo la expresión genética, y, si las concentraciones varían, producen fragmentación, baja tasa de fertilización, mala calidad embrionaria y reducción de la tasa de embarazo (González *et al* 2012).

Apoptosis abortiva

La etiología alternativa por daño de doble hebra en espermatozoides de varones infértiles provoca una vía apoptótica abortiva. Las células gaméticas sufren una alta diferenciación para ser espermatozoides maduros, si la célula pierde la capacidad de una muerte programada por apoptosis, la diferenciación a una célula germinal haploide puede contener fragmentación del ADN en el núcleo, así como la capacidad de diferenciación a una célula madura funcional, perdiendo la capacidad de fertilización (Sakkas y Alvarez 2010, González *et al* 2012).

Estrés oxidante

Las especies reactivas al oxígeno (ERO) juegan un papel importante positivo para modular la proliferación celular, diferenciación y función, pero pueden tener efectos negativos dado que son altamente reactivos, dañando el ADN. En el semen las ERO son controladas por los antioxidantes seminales. Uno de los orígenes del estrés oxidante es consecuencia de los mecanismos apoptóticos, la infiltración de leucocitos o la falla del sistema de defensa antioxidante (Sakkas y Alvarez 2010, González *et al* 2012).

Causas extrínsecas.

Periodo de tiempo de la eyaculación

La calidad del ADN espermático disminuye progresivamente en el tiempo posterior a la eyaculación. Los resultados de 11 muestras de especies criopreservadas y descongeladas mostraron que la concentración de P2 está relacionada con la fragmentación (González *et al* 2012).

Métodos de recolección, extensores y tratamientos post-eyaculación

Métodos de recolección de semen, extensores y pre-tratamientos (protocolos de lavado) tienen efectos sobre la calidad del ADN espermático. Se ha mostrado que los eyaculados

recogidos por vagina artificial tienen un menor porcentaje de fragmentación del ADN (González *et al* 2012).

Temperatura de almacenamiento y criopreservación

Se sabe que las temperaturas entre 5 y 15 °C mantienen el ADN intacto durante largos periodos de tiempo, así cuanto mayor sea la temperatura más drástico será el aumento de fragmentación de ADN espermático. La criopreservación es una ventaja para conservar los espermatozoides de individuos que se someten a terapia, tienen varicocele o por problemas de fertilidad, pero la técnica puede causar problemas y cambios en la estructura y funcionalidad del espermatozoide. Diferentes estudios de fragmentación del ADN espermático antes y después de la congelación han mostrado que pueden disminuir la longevidad del ADN (González *et al* 2012).

Estrés oxidante post-testicular

Estudios recientes demuestran que los espermatozoides inmaduros, producen altos niveles de ERO, las cuales pueden inducir el daño en el ADN de los espermatozoides maduros. El daño podría ser producido antes de la espermiación en los conductos seminíferos, el epidídimo y después de la eyaculación. Las ERO pueden causar daño en el ADN directamente (rompiendo la cadena de ADN) o indirectamente por la activación de caspasas y endonucleasas (Sakkas y Alvarez 2010, González *et al* 2012).

Varicocele

Aproximadamente del 15 al 20% de los varones tiene problemas de varicocele (dilatación de las venas del cordón espermático). Es la causa más común de la mala producción de semen y disminución de su calidad (González *et al* 2012).

Infecciones Bacterianas

Los pacientes humanos con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium* presentan bajos resultados de análisis seminal, un incremento en la fragmentación de ADN, además de un bajo potencial fertilizante en comparación con espermatozoides de individuos fértiles (González *et al* 2012).

Edad

Existen estudios que muestran un aumento significativo en el daño al ADN espermático con la edad y sugieren que la fragmentación es menor en hombres menores a 35 años (González *et al* 2012).

Abstinencia

Los primeros estudios sobre abstinencia, señalan que no hay efectos negativos en la viabilidad, morfología o movilidad del espermatozoide. La calidad de la cromatina sin embargo indica lo contrario en un periodo corto de tiempo (24 h), ya que mientras más corto sea el periodo de abstinencia entre eyaculaciones, es menor el índice de fragmentación del ADN espermático (González *et al* 2012).

Temperatura del testículo

La función testicular depende de la temperatura, en algunas especies animales la posición de los testículos en el escroto asegura que se mantengan entre 2 y 8 °C por debajo de la temperatura corporal (González *et al* 2012).

Reacción a procedimientos clínicos, medicamentos o vacunas

Se ha informado que la exposición a la quimioterapia y radioterapia también puede resultar en la inducción de la fragmentación de ADN espermático. Algunas vacunas afectan negativamente la calidad del ADN, se ha mostrado que Miloxan (vacuna contra infecciones producida por bacterias anaerobias) aumenta el porcentaje de fragmentación hasta 10 veces. Sin embargo, parece reversible y se recomienda tomar muestra al menos un mes posterior a la vacunación (Sakkas y Alvarez 2010, González *et al* 2012).

Exposición a sustancias químicas ambientales

Ciertos contaminantes ambientales pueden inducir la fragmentación y/o inducir estrés oxidante. Estudios han asociado los altos niveles de contaminación en el aire con el aumento del daño al ADN (Sakkas y Alvarez 2010, González *et al* 2012).

15. Técnicas de evaluación de la fragmentación del ADN

Las técnicas que existen para estudiar fragmentación del ADN espermático miden la susceptibilidad diferencial de ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos,

como el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA), detección del rompimiento de la hibridación *in situ* con fluorescencia (DBD-FISH), dispersión de la cromatina espermática (SCD), electroforesis unicelular en gel, TUNEL y ISNT (Cuadro II) (Morales *et al* 2007, Vázquez 2012).

Cuadro II. Técnicas para evaluar fragmentación			
Técnica	Fundamento	Ventajas	Desventajas
SCSA (Estudio de la estructura de la cromatina espermática)	Se basa en la susceptibilidad del ADN para ser desnaturalizado por medio de soluciones acidas y las propiedades metacromáticas del naranja de acridina para discriminar entre rupturas de cadena doble o sencilla al intercalarse entre la cadena de ADN.	Punto de corte establecido (30%) para diferenciar de hombre fértiles e infértiles.	Equipo sofisticado y costoso. Capacitación técnica. La objetividad radica del observador.
DBD-FISH (Detección de rompimiento del ADN-Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia)	Se basa en la capacidad de soluciones alcalinas para desnaturalizar el ADN o partir de los extremos con rupturas de cadena doble y sencilla y la hibridación de dichas rupturas con nucleótidos marcados con algún fluorocromo.	Revela modificaciones estructurales de la cromatina. Permite evaluar daño de célula a célula, <i>in situ</i> y en secuencias específicas del ADN.	Procedimiento sofisticado y costoso. Requiere de personal especializado.
EUG (Ensayo de electroforesis unicelular en gel)	Se fundamenta en la tasa de rapidez de migración de pequeños fragmentos de ADN hacia el ánodo de un campo de electroforesis en comparación con el ADN no fragmentado.	Bajo costo. Es sensible y requiere de pocas células para su análisis. Altamente reproducible.	Lenta ejecución Requiere evaluador especializado.
SCD (Ensayo de la dispersión de la cromatina)	Se fundamenta en base a la capacidad que tiene el ADN para ser desnaturalizado por tratamientos ácidos y su posterior desproteización que induce relajación de bucles de ADN, los cuales se visualizan como halos en aquellos espermatozoides con ADN intacto	Análisis simple de resultados. Pueden implementarse otras técnicas junto con esta, para analizar otros aspectos relacionados con la fragmentación del ADN.	
TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling)	Se basa en la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de la cadena de ADN que presentan rupturas (3' -OH) tanto de cadena simple como doble por una transferasa terminal.	Simultáneamente puede detectar rupturas de cadena sencilla y doble. Cumple con parámetros de control de calidad.	Equipo sofisticado y costoso. Personal especializado. El daño celular no puede ser cuantificado. Niveles de marcaje intermedios e irregulares
ISNT	Es una forma modificada del TUNEL, por el cual el fundamento es el mismo, pero utiliza timidina marcada radioactivamente y es incorporada por la ADN polimerasa.	Identifica niveles variables y apreciables de daño del ADN endógeno. Reacción de marcaje directo.	Solo marca rupturas de cadena sencilla y carece de sensibilidad. Personal especializado. Equipo sofisticado y costoso.
Tomado de Vázquez 2012.			

Electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa)

Es una técnica que se ha venido consolidando a través de los años. En 1984 Ostling y Johanson modificaron la técnica de Rydberg y Johanson (Rydberg y Johanson 1978, estimación del daño del ADN en células individuales) al añadir electroforesis a las células después de haber sido sometidas a lisis, posteriormente las tiñeron con bromuro de etidio para estimar el daño en el ADN de cada una utilizando la intensidad de fluorescencia. La técnica de Ostling tiene dos desventajas, la primera es que debido a la gran cantidad de ARN, no es posible estimar la cantidad de ADN, la segunda es que la sensibilidad es limitada debido a la escasa disociación de la cromatina, manteniendo la estructura terciaria y cuaternaria del ADN, lo cual dificulta la predicción de movimiento de la molécula. Normalmente el ADN de bajo peso molecular presenta un mayor corrimiento en respuesta a una corriente eléctrica. En 1988 Singh y colaboradores modificaron la metodología anterior y realizaron la electroforesis en condiciones alcalinas para disociar parcialmente la estructura secundaria del ADN y disociar la estructura terciaria y cuaternaria, esto permitió que el movimiento del ADN en la agarosa fuera más predecible, además de que las condiciones alcalinas también degradan el ARN. De esta forma, la solución de lisis provee excelentes condiciones para disociar el ADN nuclear y la electroforesis en condiciones alcalinas relaja el ADN y elimina los residuos de ARN que pueden interferir con la interpretación de daño al ADN (Singh 2000).

Los daños que se detectan son lesiones iniciales o primarias. La ventaja de esta técnica de Singh (2000), es que tiene fácil análisis de los datos de las células individuales y se puede estudiar la heterogeneidad entre las poblaciones celulares, se pueden usar diferentes condiciones de electroforesis para el rompimiento de dos hebras, una hebra o sitios lábiles álcali y también se puede analizar la cinética de reparación del ADN fácilmente. En la electroforesis unicelular en gel en condiciones neutras o cercanas a la neutralidad la migración de ADN aumenta por rupturas de hebra doble, cuando el pH es cercano a 12 la migración se incrementa por rupturas de hebra sencilla y doble, y cuando el pH es cercano o menor a 10 se puede estimar el daño de doble hebra. Otra ventaja es su elevada sensibilidad y también que se requieren pocas células para su análisis (Haines *et al* 1998).

Es de gran importancia estudiar las células gaméticas; en los espermatozoides la información obtenida a través de un análisis seminal, no aporta un panorama completo sobre la capacidad de dar lugar a un embrión sano. Un estudio exhaustivo del factor

masculino requiere determinar el índice de fragmentación o migración del ADN espermático (Morales *et al* 2007).

Por lo anterior, en este estudio se pretende analizar el daño al ADN de los espermatozoides de donantes y pacientes de banco de semen, ocasionados por la congelación convencional y rápida; para ello se utilizó la técnica de electroforesis unicelular en gel alcalina y neutra.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que los varones infértiles tienen mayor cantidad de espermatozoides con rupturas en el ADN, y que este hecho puede tener un impacto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Las muestras de semen que presentan alta frecuencia de daño en el ADN están asociadas con disminución en la tasa de fertilización y la pérdida del propio embrión.

Se sabe que el semen donante es rigurosamente analizado y los parámetros de calidad están por encima de los estándares indicados por la OMS (2010) para muestras normales.

En los bancos de semen las muestras de donantes y pacientes son almacenadas a bajas temperaturas. Se ha comprobado que la técnica convencional donde se congela a las células gradualmente, altera la movilidad y vitalidad de las células espermáticas. La técnica rápida es otra alternativa para criopreservar las muestras, la cual, podría menor daño celular y genético.

Por lo anterior en este estudio se analizó en semen de donantes y pacientes la fragmentación del ADN que se indujo por criopreservar los espermatozoides bajo las técnicas de congelación rápida y convencional.

IV. HIPÓTESIS

Dado que la congelación de espermatozoides por la técnica convencional favorece la cristalización de los componentes intracelulares, la cual genera daño en el ADN, entonces al acortar el tiempo de congelación con la técnica rápida se reducirá el daño sobre el ADN espermático en muestras de semen de donantes y pacientes.

V. OBJETIVOS

1. General

Determinar el grado de fragmentación del ADN espermático de muestras de semen de donantes y de pacientes, criopreservadas por las técnicas convencional y rápida mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel a pH alcalino (12.1) y neutro (9).

2. Particulares

- Realizar el análisis seminal de las muestras de semen en fresco y después de la criopreservación de semen de donante y pacientes obtenidas de banco.
- Estimar el daño en el ADN espermático mediante electroforesis unicelular en gel con pH alcalino y neutro de muestras de semen de pacientes y donantes de banco.
- Determinar las diferencias de los resultados del análisis seminal y del daño al ADN espermático sometidos a la técnica de congelación convencional y rápida.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección de la muestra

Las muestras espermáticas se obtuvieron de 11 donantes y 4 pacientes que asistieron a la clínica HISPAREP del Hospital Español y que tuvieron de tres a cinco días de abstinencia sexual. Las muestras se obtuvieron por masturbación y se recolectaron en un recipiente estéril, posteriormente se incubaron por 30 min a 37 °C, tiempo necesario para la licuefacción. El estudio se realizó con el consentimiento de los individuos.

Análisis seminal

Para elaborar el análisis seminal, se realizaron las pruebas macroscópicas (volumen, viscosidad, pH y color) y microscópicas (concentración, movilidad, vitalidad y morfología). Se utilizaron los parámetros marcados por la OMS en el 2010.

Análisis macroscópico

Licuefacción y viscosidad del semen

Para la licuefacción se observó la muestra durante 15 a 60 min, esperando que se alcanzara un estado homogéneo, de no ser así, se realizó mecánicamente. La viscosidad se evaluó a los 30 min de haber obtenido la muestra seminal, resultando completa o incompleta en caso de que tuviera filamentos.

Apariencia del semen

Después de la licuefacción se analizó el aspecto del semen, observando el color o presencia de otras células en el eyaculado.

pH

El pH se midió de inmediato después de la licuefacción, colocándose una gota del semen en una tira reactiva al pH (Merck; Dermstadt, Alemania).

Volumen

Se pesó primero el frasco etiquetado y posteriormente se volvió a pesar una vez contenido el semen, finalmente se restó el valor del recipiente vacío con el valor del recipiente con la muestra, obteniendo la diferencia del peso. El resultado obtenido en g se expresó en mL.

Análisis microscópico

Concentración

Se colocaron 5 μL de la muestra sobre la cámara Makler (Sefi Medical Instrument; Haifa, Israel) y se utilizó un microscopio de contraste de fases a 200X. Se contaron 10 cuadrantes en una línea vertical u horizontal. El conteo final fue la concentración de espermatozoides por mililitro.

Movilidad

El conteo de movilidad se realizó con la cámara Makler, contándose solamente los espermatozoides libres. Se contaron 100 espermatozoides con las siguientes características:

- Móviles (progresivos): Espermatozoides con movimiento activo y lineal, los cuales dan giros sobre su propio eje, independiente de la velocidad.
- Móviles no progresivos: Móviles *in situ*, movimiento en el mismo lugar (sin desplazamiento), nado en círculo pequeño.
- Inmóviles: Sin movimiento.

Vitalidad

Se utilizó la técnica de tinción vital que se basa en el principio de que las células muertas presentan daño en la membrana plasmática y por lo tanto absorberán determinadas tinciones como la eosina. Se mezclaron 5 μL de semen fresco con 5 μL de eosina al 5% (Sigma-Aldrich, EUA) y se colocaron sobre un portaobjetos, homogenizando la mezcla con una micro-pipeta y posteriormente se cubrieron con un cubreobjetos, después de un minuto se observaron en un microscopio de contraste de fases a 400x. Se contaron los espermatozoides teñidos (muertos) y no teñidos (vivos) hasta completar 100. El resultado se expresó en valor porcentual.

Morfología

Las características morfológicas se evaluaron en extensiones teñidas con Spermaform (Laboratorio Fertiméxico SA de CV). Se preparó una extensión con 5 μ L de semen y se dejó secar. Posteriormente se utilizó la solución fijadora por 3 min, seguido por el colorante A por 3 min, después se enjuagó con agua destilada y se introdujo el frotis en el colorante B por 5 min, se enjuagó con agua destilada. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente. Se contaron 100 espermatozoides a 1000X. Criopreservación del semen

Una vez alcanzado el estado de licuefacción total, se preparó la muestra, y se realizaron dos técnicas de congelación (Figura 17).

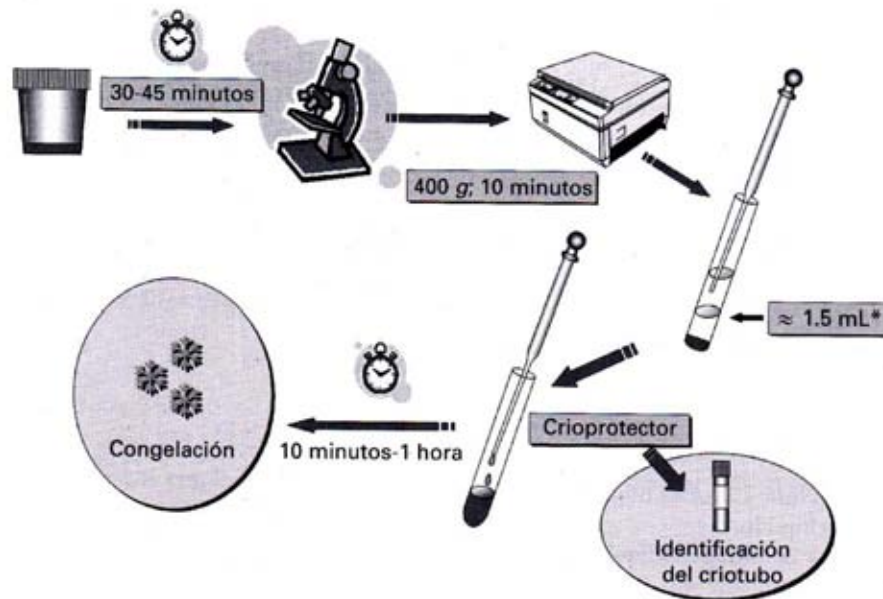


Figura 17. Preparación de la muestra para congelación (tomada de Remohí 2008).

Congelación convencional

Se colocó la muestra en un tubo cónico de 14 mL y se concentró centrifugándola a 2000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante hasta dejar el botón celular diluido en un volumen del plasma aproximadamente de 1 mL. Posteriormente se añadió un crioprotector penetrante y uno no penetrante TYB (invineScientific; California, EUA), previamente atemperado, en una porción 1:1. La adición del crioprotector fue cuidadosa,

realizándose gota a gota y mezclando la muestra con la ayuda de la pipeta, de manera que se evite el choque osmótico a las células espermáticas, en un tiempo máximo de 10 min. Finalmente se pasó de inmediato a la criopreservación del tubo.

En un tanque criogénico se colocó el nitrógeno líquido mínimo necesario (10 cm del fondo), suspendiéndose tres crio-tubos con ayuda de una escalerilla de aluminio por 24 h, después se sumergió directamente en nitrógeno a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por último, los tubos se pasaron al tanque de almacenamiento de las muestras hasta el momento de su uso. Se realizó una prueba de descongelación con un crio-tubo 24 h posteriores a la congelación y se cuantificó la movilidad y la concentración.

Congelación rápida

La muestra se concentró centrifugándola a 2000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante hasta dejar el botón celular diluido en un volumen del plasma aproximadamente de 1 mL. Posteriormente se añadió un crioprotector penetrante y uno no penetrante TYB (inviviteScientific; California, EUA), previamente atemperado, en una porción 1:1. Posteriormente se dejó a temperatura ambiente por 25 min antes de proceder a la congelación, tiempo que se invirtió en la rotulación o identificación del recipiente donde se conserva la muestra de semen.

Sobre un bloque de hielo seco se excavaron pocillos pequeños con lápiz diamante y con ayuda de una pipeta Pasteur se depositaron pequeñas cantidades de la mezcla del semen-crioprotector sobre los pocillos. Cuando las pildoras pierdan el brillo y adquieran un color perla opalescente estarán listas para depositarse dentro de un criotubo/gobelete, previamente introducido en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde se almacenaron hasta el momento de la descongelación.

Descongelación

Se descongelaron las muestras en baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Posteriormente se realizó el análisis seminal.

2. Electroforesis unicelular en gel (EUG)

El ensayo de electroforesis unicelular en gel se realizó siguiendo el protocolo de Tice y Vasquez (1999) para el ensayo alcalino y para el ensayo neutro se realizaron

modificaciones del protocolo de Singh y colaboradores (2000) utilizando reactivos Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Para este estudio se utilizó una muestra de semen que fue dividida en dos controles; el control negativo se conformó de muestras de semen en fresco sin ningún tratamiento y el control positivo, donde las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrogeno.

EUG Alcalina

Se prepararon laminillas con tres capas de agarosa, la primera capa fue con agarosa de punto de fusión normal (al 1 %), la segunda fue una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión (al 0.7 %) y muestra seminal y la tercera sólo con agarosa de bajo punto de fusión. Se realizó la primera lisis NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DTT y Triton X-100) por 1 h, posteriormente se realizaron dos lavados de las laminillas con PBS y después se realizó una segunda lisis [NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM y proteinasa K (10 µm/mL)] a 37 °C por 2 h. Al finalizar el tiempo de la segunda lisis las laminillas se colocaron en la cámara de electroforesis con solución amortiguadora de corrimiento a pH 12.1 (NaOH 10N, EDTA 200 mM), por 10 min y posteriormente se corrieron por 5 min a 25 V y 300 mA. Al finalizar se realizaron 2 lavados con solución neutra (10 min c/u) y se deshidrataron con alcohol al 70% (5 min) (Figura 19).

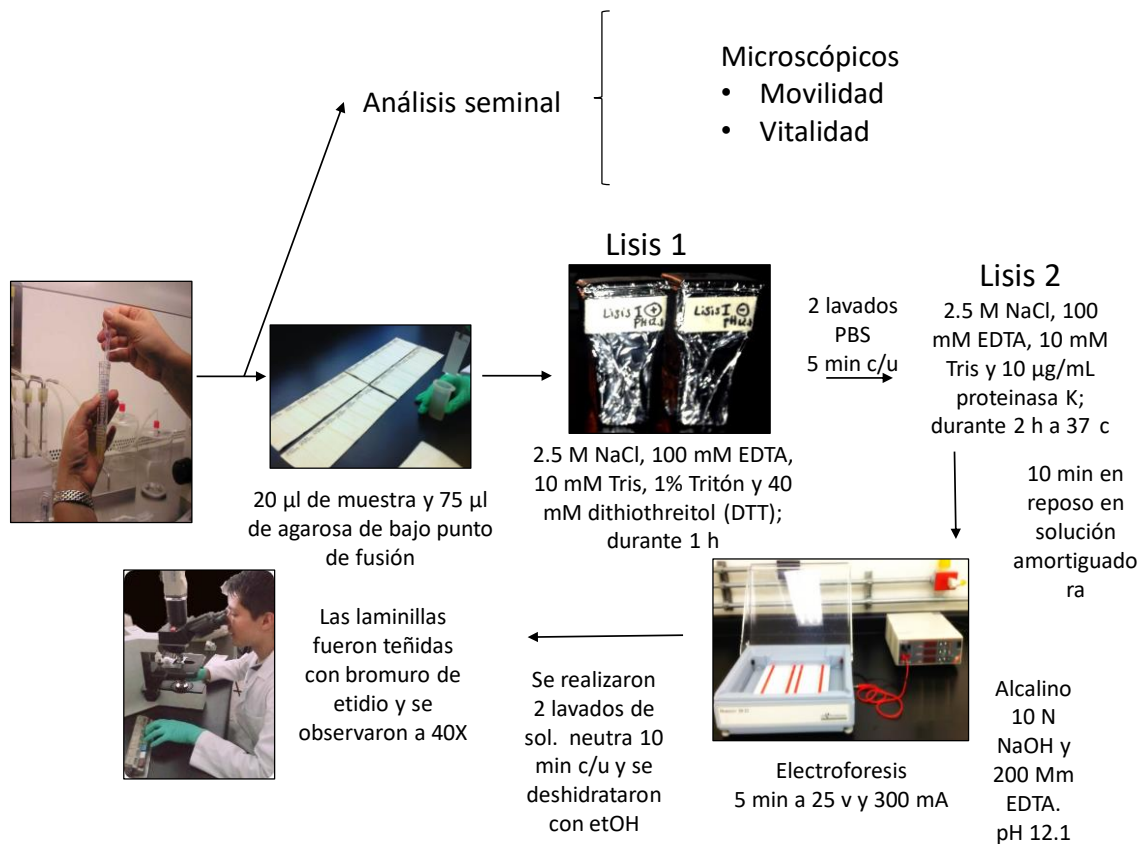


Figura 19. Electroforesis unicelular en gel pH 12.1.

EUG neutra

Para el ensayo neutro se llevó a cabo la misma metodología que en el ensayo alcalino hasta la primera lisis, después se hicieron 2 lavados con medio RPMI-1640 (5 min c/u), seguido de una segunda lisis (NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100mM, trizma 10 mM y ARNasa 10 µg/mL) por 1 h y por último las preparaciones se colocaron en una tercera lisis (NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100mM, trizma 10 mM y proteinasa K 40 µg/mL) por 1 h, una vez concluido el periodo de lisis las laminillas se llevaron a la cámara de electroforesis donde reposaron por 20 min en solución amortiguadora de corrimiento a pH 9 (Trizma 0.4 M, pH 7.5) y se corrieron durante 1 h a 12 V y 100 mA, al finalizar la electroforesis se pasaron a una solución de NaOH 300 mM y luego se realizaron dos lavados de solución neutra (10 min c/u) y por último se deshidrataron en alcohol al 70% (5 min) (Figura 20).

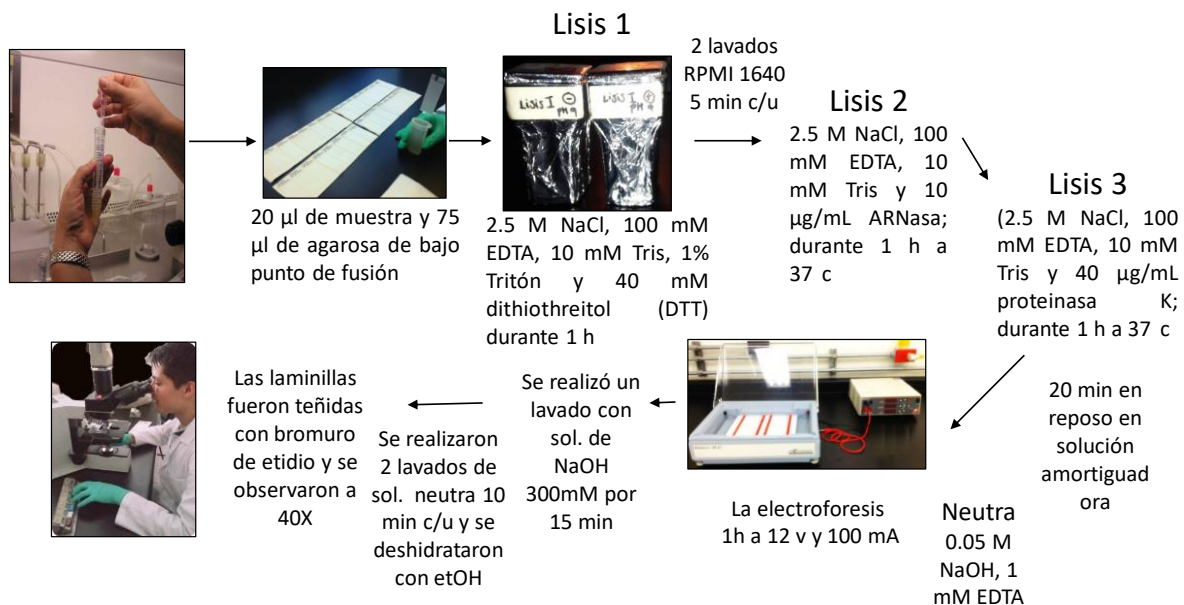


Figura 20. Electroforesis unicelular en gel pH 9

En ambos casos las laminillas se tiñeron con un colorante de bromuro de etidio y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 (filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrido de 590 nm). El daño al ADN se midió con una escala ocular adaptada al microscopio.

Al mismo tiempo que se evaluó la longitud de los cometas, se obtuvo el índice de migración (IMg), o índice de daño; donde se clasificó del 1 al 4 según la longitud del cometa (cabeza y cola) bajo los siguientes parámetros: núcleos sin daño 0-30 µm, daño bajo 31-60 µm, daño medio 61-90 µm, daño alto >90 µm (Rodríguez-Mercado *et al* 2011). Los resultados se expresaron en porcentaje y se aplicó la siguiente fórmula:

$$IMg = \frac{1(\text{cel. sin daño}) + 2(\text{cel. daño bajo}) + 3(\text{cel. daño medio}) + 4(\text{cel. daño alto})}{\text{Total de células}}$$

Se evaluaron 51,200 células en total, divididas en cuatro grupos:

Número de células por grupo	
Control negativo	6,400
Control positivo	6,400
Donantes	28,800
Pacientes	9,600

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20 con una significancia ≤ 0.05 , utilizando pruebas paramétricas (T de Student, ANOVA-Tukey) y no paramétricas [Ji cuadrada (χ^2)], de acuerdo al comportamiento de los datos.

VII. RESULTADOS

1. Análisis seminal antes y después de la criopreservación de muestras de semen de pacientes y donantes de banco

Parámetros seminales en fresco

En el cuadro III se aprecian los datos correspondientes a la morfología y concentración de muestras de semen de pacientes y donantes antes de la congelación. Se observa mayor porcentaje de espermatozoides con morfología normal para el grupo de los donantes, de igual manera se observa que en las muestras de semen de donantes, la concentración de espermatozoides es mayor en relación con los pacientes.

Cuadro III. Morfología y concentración espermática de donantes y pacientes, previo a la congelación (media \pm error estándar)		
	Fresco	
	Morfología (%)	Concentración (millones/mL)
Donante	9.33 \pm 0.36	70.75 \pm 4.00
Paciente	2.75 \pm 0.48*	41.75 \pm 8.44*

Con la prueba t de Student, * $P < 0.05$ vs. donantes misma columna.

Parámetros seminales previos y posteriores a la congelación

En el cuadro IV se observan los resultados de vitalidad espermática de los donantes y pacientes previo y posterior al proceso de congelación – descongelación. Los resultados muestran disminución de la vitalidad en las muestras de los pacientes y donantes en relación a la congelación.

Cuadro IV. Vitalidad espermática de donantes y pacientes, pre y post-congelación (media \pm error estándar)			
	Fresco (%)	C. convencional (%)	C. rápida (%)
Donantes	83.50 \pm 1.42 ^a	0.06 \pm 0.01 ^{a, b}	0.05 \pm 0.02 ^{a, b, c}
Pacientes	60.50 \pm 3.71	0.04 \pm 0.01 ^{b, c}	0.01 \pm 0.00 ^b

Con la prueba t de Student, ^a $P < 0.05$ vs. donantes misma columna, ^b $P < 0.05$ vs. fresco mismo grupo y ^c $P < 0.05$ vs. congelación convencional mismo grupo.

En el cuadro V se observa la movilidad espermática de donantes y pacientes, en fresco y posterior a la congelación por técnica convencional y rápida. Al comparar la movilidad (progresiva, no progresiva e inmóvil) en el grupo de los donantes en fresco contra los donantes congelación rápida y convencional, encontramos diferencia significativa en la movilidad no progresiva e inmóvil. En la comparación en donantes de la congelación rápida contra la convencional se observó diferencia significativa en la movilidad progresiva e inmóvil. En el grupo de los pacientes en fresco se encontró significancia contra la movilidad progresiva de los pacientes congelación rápida, y se encontró total significancia en la movilidad contra los pacientes congelación convencional. En el caso de la comparación entre tipos de congelación de pacientes, se encontró diferencia significativa en las movilidades progresivas e inmóviles.

Por último se encontró total diferencia significativa al comparar donantes contra pacientes tanto de las muestras en fresco como entre las distintas técnicas de congelación.

Cuadro V. Movilidad espermática de donantes y pacientes en fresco, pre y post-congelación (media ± error estándar)						
Movilidad (%)						
	Donante			Paciente		
	Fresco	Convencional	Rápida	Fresco	Convencional	Rápida
Progresivos	71.58 ± 2.59	2.67 ± 0.58 ^b	2.50 ± 0.83	37.25 ± 6.46 ^c	2.75 ± 0.75 ^{a, d}	0.50 ± 0.50 ^{a, b, c, e}
No progresivos	10.83 ± 0.79	2.33 ± 0.51 ^a	1.92 ± 1.02 ^a	13.00 ± 2.74 ^c	0.75 ± 0.48 ^d	0.00 ± 0.00 ^{a, e}
Inmóviles	17.58 ± 1.96	95.00 ± 1.01 ^a	95.58 ± 1.78 ^{a, b}	50.25 ± 6.29 ^c	96.50 ± 1.04 ^d	99.50 ± 0.50 ^{a, b, e}

Con la prueba t de Student, ^a $P < 0.05$ vs. fresco mismo grupo, ^b $P < 0.05$ vs. convencional mismo grupo y ^c $P < 0.05$ vs. donantes fresco, ^d $P < 0.05$ vs. donantes rápido y ^e $P < 0.05$ vs. donantes convencional.

2. Evaluación del índice de daño en el ADN espermático pre y post-congelación de muestras de semen de pacientes y donantes

Análisis de fragmentación de la congelación rápida, pH 12.1 y pH 9

Para el daño al ADN se tomó como medida en μm la longitud del cometa (cabeza más cola). Los datos se expresan como media ± error estándar de los cuatro grupos evaluados: **control negativo, donantes, pacientes y control positivo**; en las figuras el eje de la Y está representado por los micrómetros.

En la Figura 21 se observan los resultados de las evaluaciones de la congelación rápida a pH 9. Al comparar el grupo **control negativo** contra el de **donantes** y **pacientes** no se observan cambios significativos en la longitud del cometa, los datos del grupo **control positivo** muestran diferencia significativa en la longitud de los cometas, comparado con los demás grupos. Los resultados de la congelación rápida a pH 12.1 (Figura 22), muestran diferencias estadísticas en la longitud de los cometas en todos los grupos comparados con el **control negativo**, diferencias que se mantienen al comparar **pacientes** contra **donantes**.

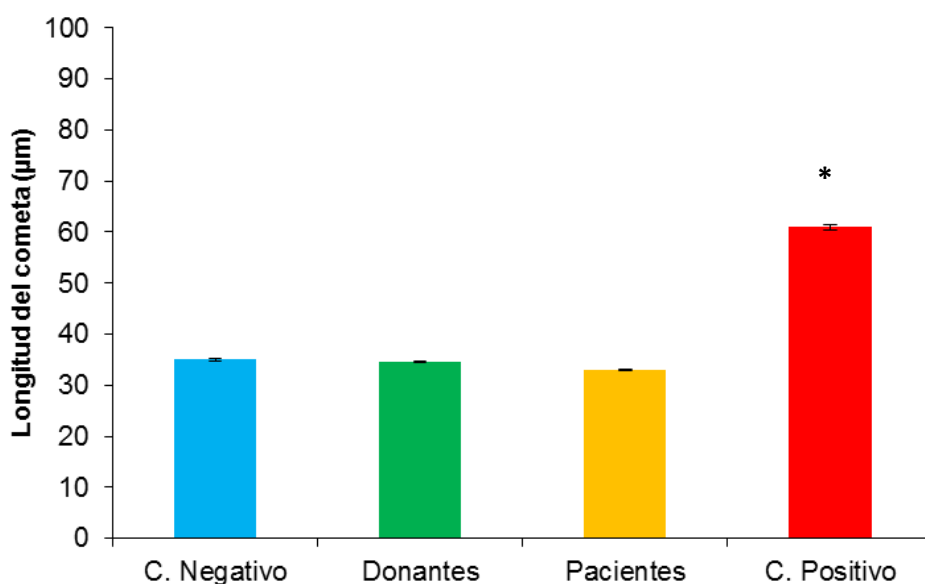


Figura 21. Longitud del cometa de los espermatozoides de donantes y pacientes después de la **congelación rápida**, evaluación a **pH 9**. Con la prueba ANOVA-Tukey, ^a $P < 0.01$ vs. control negativo, ^b $P < 0.01$ vs. donantes y ^c $P < 0.01$ vs. pacientes.

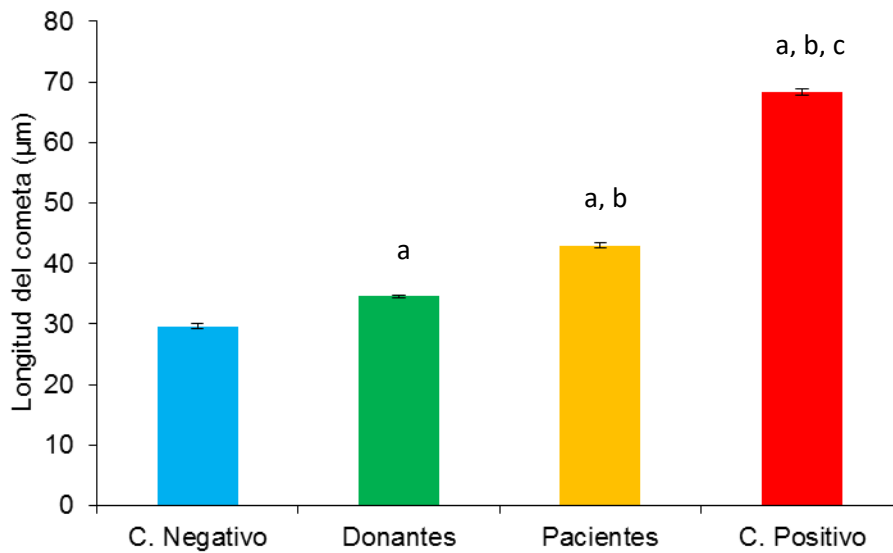


Figura 22. Longitud del cometa de los espermatozoides de donantes y pacientes después de la **congelación rápida**; evaluación a **pH 12.1**. Con la prueba ANOVA-Tukey, ^a $P < 0.01$ vs. control negativo, ^b $P < 0.01$ vs. donantes y ^c $P < 0.01$ vs. pacientes.

Análisis de la congelación convencional a pH 12.1 y pH 9

En las figuras 23 y 24 se muestran los resultados de la evaluación de la longitud de los cometas a pH 9 y pH 12.1 respectivamente por la congelación convencional. A pH 9 las diferencias estadísticas se muestran al comparar el **grupo control negativo** contra **pacientes** y **control positivo** (Figura 23), así como también al comparar **donantes** contra **pacientes**. En los resultados de la congelación convencional pH 12.1 (figura 24) se obtuvo diferencia significativa entre **donantes** y **pacientes** observándose mayor daño en los pacientes, además se observó significancia de los grupos anteriormente mencionados contra el grupo **control negativo**.

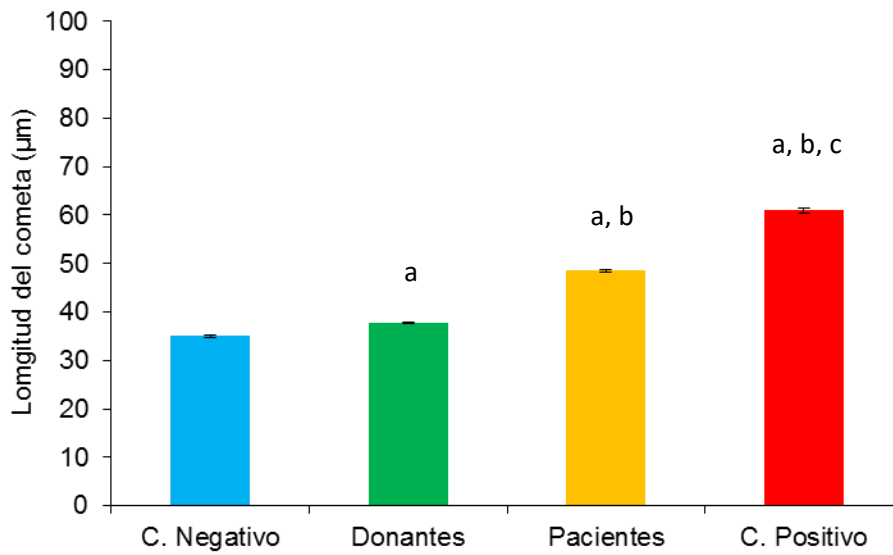


Figura 23. Longitud del cometa de los espermatozoides de donantes y pacientes después de la **congelación convencional**; evaluación a **pH 9**. Con la prueba ANOVA-Tukey, ^a $P < 0.05$ vs. control negativo, ^b $P < 0.01$ vs. donantes y ^c $P < 0.01$ vs. pacientes.

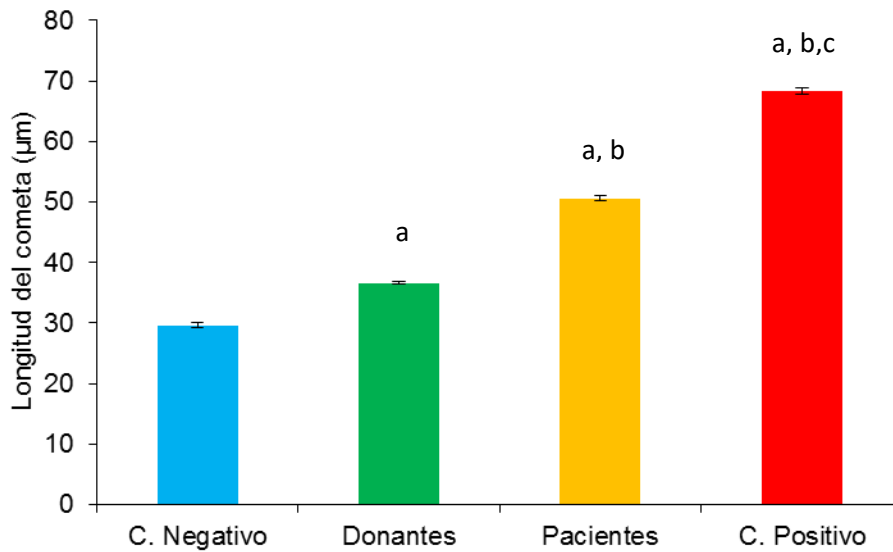


Figura 24. Longitud del cometa de los espermatozoides de donantes y pacientes después de la **congelación convencional**; evaluación a **pH 12.1**. Con la prueba ANOVA-Tukey, ^a $P < 0.05$ vs. control negativo, ^b $P < 0.01$ vs. donantes y ^c $P < 0.01$ vs. pacientes.

Comparación de tipos de congelación a pH 9 y pH 12.1

Se realizó un análisis comparativo de la longitud de los cometas de las técnicas de congelación con el mismo pH y otro más comparando las técnicas de congelación con pH distinto.

En la Figura 25, al evaluar la congelación convencional contra la rápida a pH 9, no se observó diferencia significativa para el grupo de los **donantes**, en cambio en los **pacientes** se observó diferencia significativa en la congelación convencional que fue mayor contra la congelación rápida.

En la figura 26 al comparar el grupo de los **donantes** con distinta técnica de congelación, no se encontró diferencia significativa, caso contrario al grupo de los pacientes, donde se observó diferencia significativa mostrando mayor daño la congelación convencional.

En condiciones alcalinas al comparar los **donantes** con distinta técnica de congelación, no se encontró diferencia significativa. Los **pacientes** tuvieron una diferencia significativa marcada por el daño que género la congelación convencional (Figura 26).

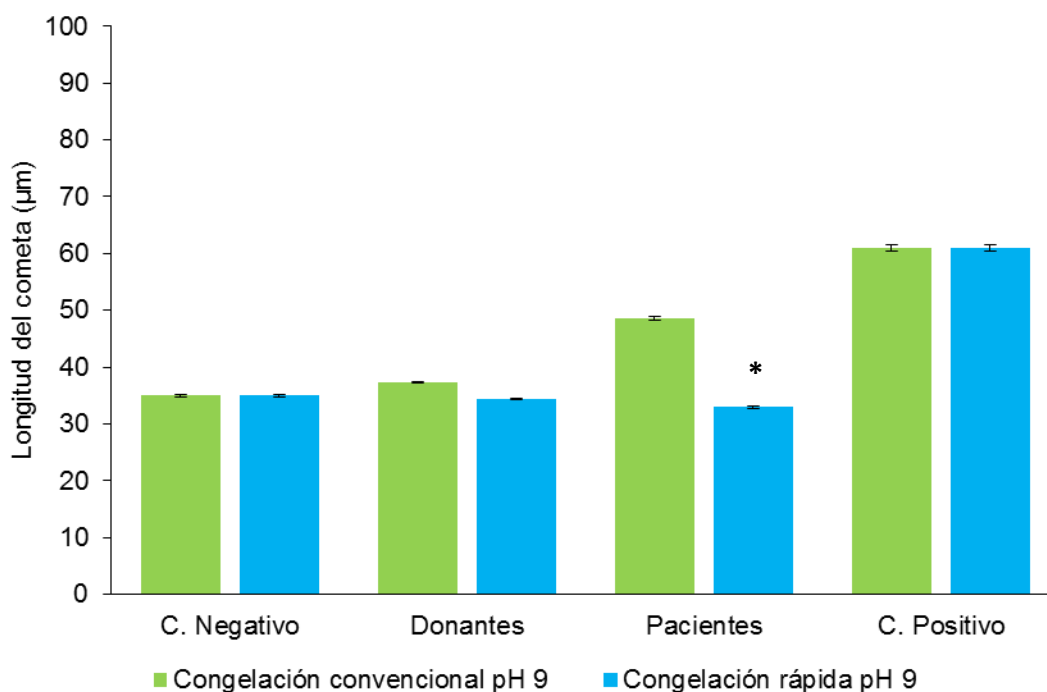


Figura 25. Longitud del cometa de los espermatozoides de donantes y pacientes después de las **congelaciones convencional y rápida**, evaluación a **pH 9**. Con la prueba ANOVA-Tukey, * $P < 0.01$ vs. congelación convencional.

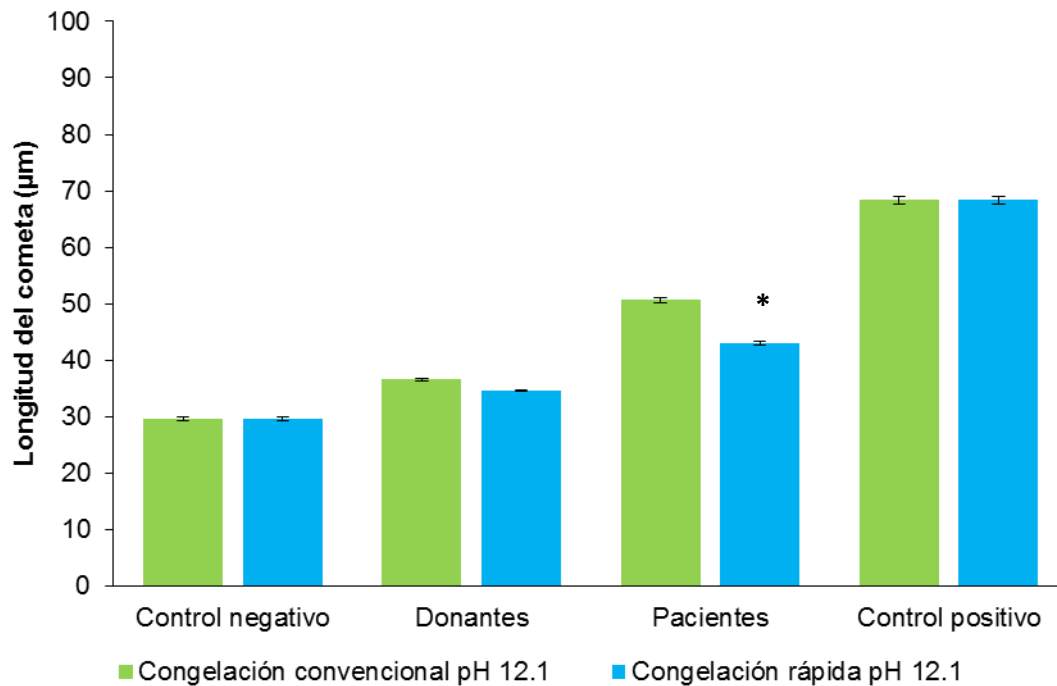


Figura 26. Longitud del cometa de los espermatozoides de donantes y pacientes después de las **congelaciones convencional y rápida**, evaluación a **pH 12.1**. Con la prueba ANOVA-Tukey, * $P < 0.01$ vs. congelación convencional.

Comparación entre pH alcalino y neutro en ambos tipos de congelación de pacientes y donantes

En la figura 27 se compararon grupos entre sí con distinto pH, se encontró que los donantes de congelación rápida fueron similares. En cambio, hubo diferencia significativa en el grupo de los pacientes con congelación rápida, ya que se observa mayor longitud de los cometas en el pH 12.1.

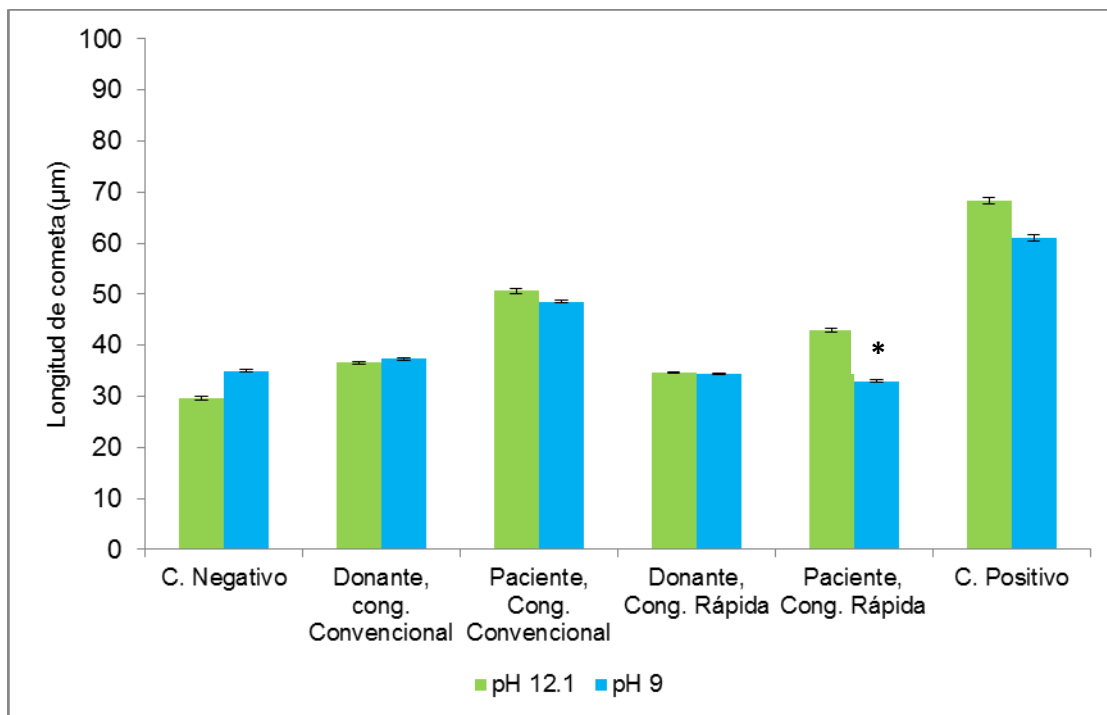


Figura 27. Longitud del cometa de los espermatozoides de donantes y pacientes después de las **congelaciones convencional y rápida**, evaluación a **pH 9 y pH 12.1**. Con la prueba ANOVA-Tukey, * $P < 0.01$ vs. pH 9.

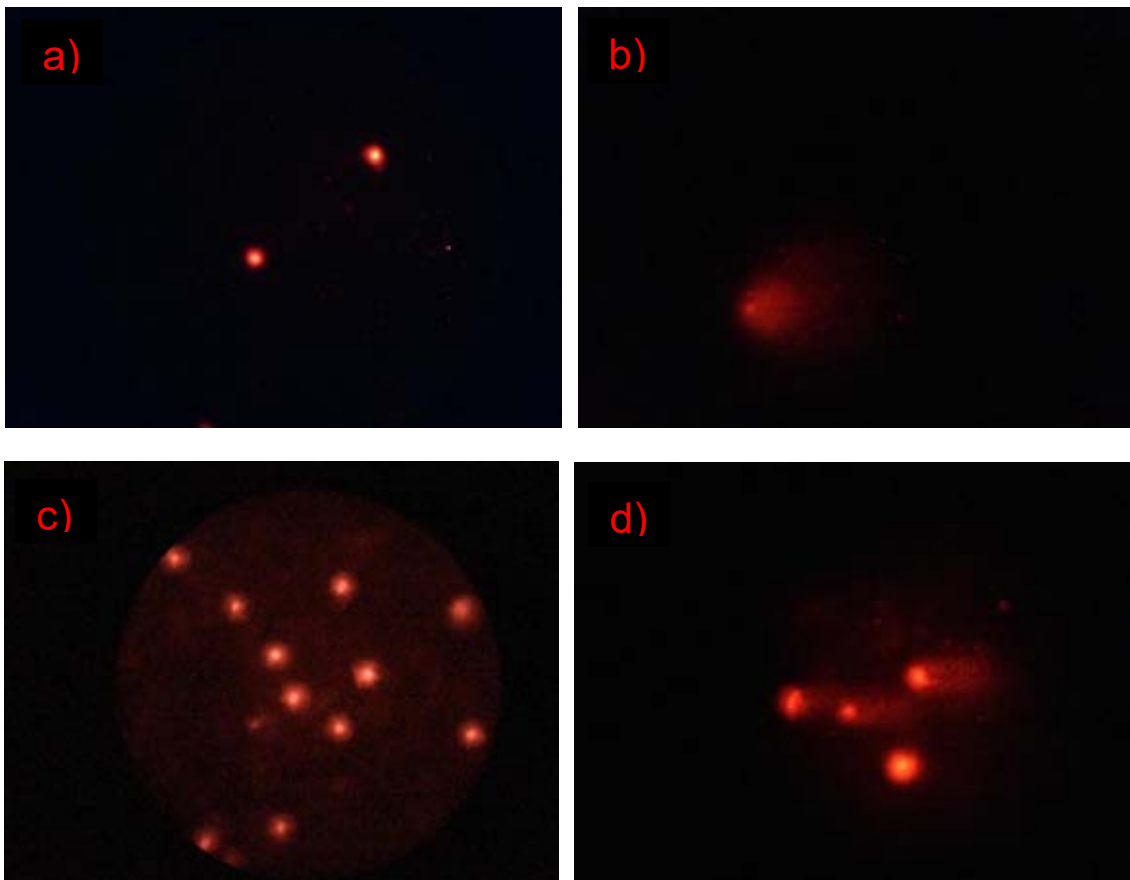


Figura 28. Fotomicrografías, se observan distintos corrimientos a 400X a) células sin daño pH 9, b) cél. con daño pH 9, c) cél. sin daño pH 12.1 y d) cél. con daño pH 12.1.

Índice de migración del ADN espermático

En el eje de la y se observa la escala del índice de migración, en el eje de la x se ubican las técnicas de congelación y distintos pH.

En la congelación rápida a pH 9 se observó diferencia significativa del grupo **Control positivo** respecto al **negativo**. En el pH 12.1 se encontró significancia en todos los grupos con respecto a su **control negativo**.

En la congelación convencional pH 9, los **pacientes** y el **control positivo** mostraron significancia al compararse con el **control negativo**. Finalmente, en el pH 12.1 al comparar con su **control negativo** se encontró significancia por parte de todos los grupos.

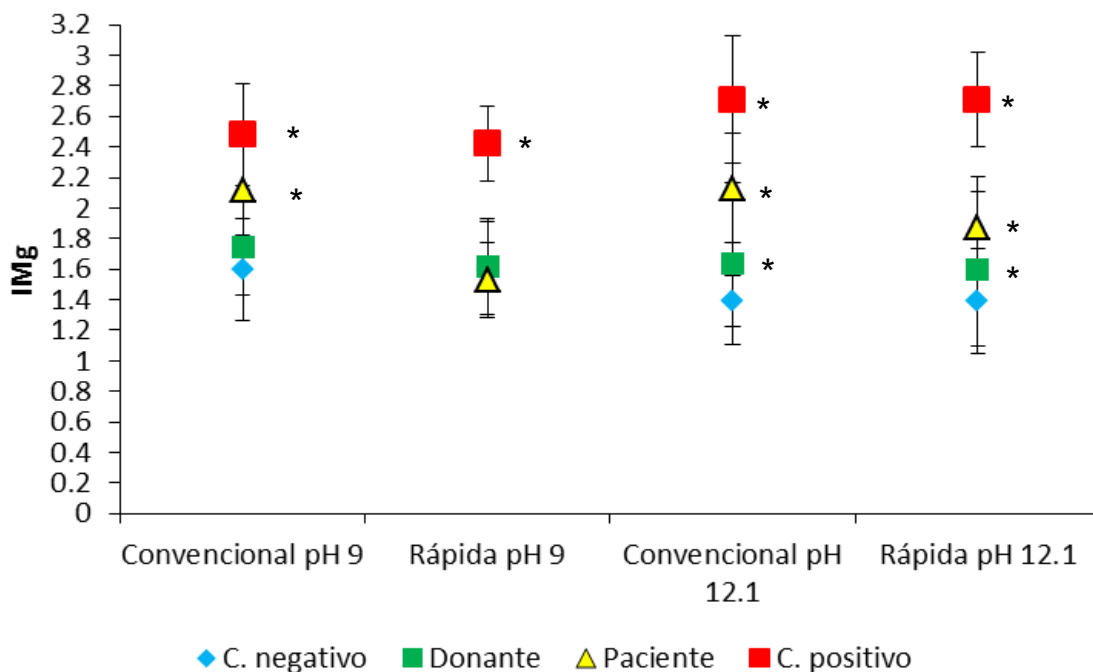


Figura 32. Índice de migración (IMg) que estima el daño al ADN espermático de donantes y pacientes después de las **congelaciones rápida y convencional**, evaluación a **pH 9 y pH 12.1**. Con la prueba ji cuadrada, * $P < 0.05$ vs. control negativo.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se exponen los daños en células espermáticas causados por criopreservar las muestras de semen mediante las técnicas de congelación rápida y convencional. Al comparar dichas técnicas de congelación se confirma la premisa de que la congelación rápida (en la cual el tiempo del procedimiento es reducido en comparación con la congelación convencional) genera un daño menor al momento de la evaluación post-congelación.

El análisis seminal macroscópico se hace de manera rutinaria en las muestras seminales. En este estudio los parámetros macroscópicos (licuefacción, viscosidad, pH, volumen y apariencia del semen) de muestras de donantes resultaron estar dentro de los estándares marcados por la OMS 2010, caso contrario se observó para los pacientes los cuales presentaron problemas varios en dicho análisis. En cuanto al análisis microscópico, la concentración espermática es un parámetro que refleja la eficacia del proceso espermatogénico, así como del funcionamiento de todas las estructuras anatómicas que colaboran en la formación del eyaculado (Cooper *et al* 2009, Bonde *et al* 1998).

De acuerdo a los parámetros establecidos por la OMS 2010, la concentración normal debe ser \geq a 15 millones/mL, en nuestro estudio tanto en pacientes como en donantes se observaron valores superiores con 26.75 y 55.75 millones/mL respectivamente. Varios estudios han analizado la influencia de la edad en la calidad espermática, resultados reproductivos y salud genética de la descendencia. La mayoría de los estudios sugieren una relación de la edad con el declive en la morfología y la movilidad (Nijs *et al* 2011).

La morfología previa a la congelación entre donantes y pacientes fue distinta. En contraste con los parámetros de la OMS 2010 los pacientes se encuentran 1.25% por debajo del mínimo, clasificándose como teratozoospermia, por otro lado los donantes mostraron un aumento de 5% contra el estándar de células normales.

La vitalidad de una muestra normozoospermica debe ser \geq al 58% de acuerdo la OMS 2010. La vitalidad en fresco de las muestras de los pacientes se ubicaron 2.5% arriba del estándar, de igual manera los donantes con un 25.5%. Por otro lado después de la congelación rápida y convencional se obtuvo una disminución en la vitalidad tanto en donantes como en pacientes que no supero el 1%, indicando necrozoospermia, esto debido a cambios en la membrana por la congelación-descongelación (OMS 2010).

En nuestros resultados la movilidad espermática en fresco de los donantes y pacientes fue mayor a lo establecido con 42.41% y 10.25% respectivamente, de acuerdo a la OMS 2010 se clasificaron como normozoopérmicas. Lee y col. (2010) observaron que el proceso de la congelación y descongelación causó reducción del 66% de los espermatozoides móviles progresivos rápidos, 45% menos de los móviles progresivos lentos y 2% de los móviles no progresivos. En nuestros resultados se aprecia una disminución de la movilidad no mayor al 5%, clasificándose como astenozoospermicos de acuerdo a la OMS 2010, coincidiendo con el estudio citado.

Las células criopreservadas se almacenan a -196 °C en nitrógeno líquido. A esta temperatura no existen fenómenos ni de difusión ni de energía térmica suficiente para llevar a cabo reacciones químicas. Por tanto, las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a bajas temperaturas sino de los procesos de enfriamiento y calentamiento (Fernández *et al* 2009). La baja movilidad puede ligarse al bajo porcentaje de morfología normal pre-congelación observado en pacientes (2.75%) el cual podría incluir defectos de flagelo. En cuanto a la morfología espermática de los donantes que previamente mostraron parámetros superiores a los de la OMS, puede deberse al choque térmico que sufren los espermatozoides al momento de la congelación-descongelación.

Satirapod y col. (2011) comprobaron que la calidad de la cola de los espermatozoides difería según la técnica de congelación, ellos utilizaron la técnica convencional y otra con descenso de temperatura más rápida, siendo la última más efectiva para conservar la calidad del flagelo (Satirapod *et al* 2011). Una posible causa que generó esta severa disminución en la movilidad post-congelación, podría ser la formación de cristales en el medio extracelular, afectando la integridad del flagelo del espermatozoide, ya sea causando daños leves o mutilándola por completo.

Lim y col. (2010) observaron que al congelar muestras espermáticas por vapores o nitrógeno líquido de 150 varones con parámetros seminales normales hasta por tres meses, no se encontró diferencias significativas entre las dos técnicas respecto a movilidad y vitalidad. Nosotros en cambio encontramos diferencias significativas, independiente a la técnica de congelación, tanto en movilidad como vitalidad ambos parámetros no superaron el 5%. La vitalidad se puede ver influenciada por la transición de fases en la membrana plasmática, ya que los ácidos grasos pueden existir en estado rígido ordenado (gel) o uno más flexible y relativamente desordenado (fluido). La transición en la membrana plasmática no se da simultáneamente en todos los fosfolípidos

y por lo tanto se espera la coexistencia de dominios en estado fluido y dominios en estado gel durante la transición. Esta situación produce defectos en el empaquetamiento de las membranas y está asociado a una mayor permeabilidad de solutos a través de esta, demostrándose que al alcanzar la temperatura de transición en una bicapa determinada, se produce la mayor pérdida de solutos a través de la membrana. La mayoría de las membranas de células eucariotas tiene su temperatura de transición entre los 0 °C y los 20 °C (Fernández *et al* 2009). En nuestro estudio las pruebas de vitalidad efectuadas con eosina al 5%, la muestra se teñía en su mayoría, confirmando afectación en la membrana plasmática. Con base a lo anterior es sencillo justificar la severa disminución en el porcentaje de vitalidad.

La congelación y descongelación de los espermatozoides humanos es la causa de formación de cristales de hielo, choque osmótico; procesos que conducen a la muerte celular, daño en la membrana celular, desnaturalización de proteínas, problemas en la movilidad, alteraciones morfológicas, problemas en la reacción acrosomal. Estos procesos, además, son los responsables del incremento en los niveles de marcadores apoptóticos, alterar la calidad de los núcleos de los espermatozoides, descondensar la cromatina y desnaturalizar el ADN (Boitrelle *et al* 2012, Thomson *et al* 2008).

La mejor supervivencia de los espermatozoides humanos es cuando la velocidad de enfriamiento en un cuarto atemperado a 4/5 °C es de 0.5 a 1.0 °C/min y en un punto de fusión de -80 °C es aproximadamente de 10 °C/min, suficientemente rápido para minimizar la deshidratación y no tan lento para causar la formación de hielo intracelular (Esteves *et al* 2003). Con la técnica convencional, al tener una congelación más lenta, se forman hielos intra y extracelulares, hay cambios osmóticos, causando excesivo daño espermático. En contraste la congelación rápida favorece, previniendo el daño a la célula y conservando mejor la cola espermática (Satirapod *et al* 2011).

La formación de hielo ocurre primero en el medio acuoso extracelular durante el proceso de enfriamiento y da como resultado una alta concentración de solutos que rodea a las células vivas, causando efectos de osmosis al conducir el agua fuera de las células (Zou *et al* 2013). Este fenómeno puede ser benéfico, ya que al sacar el agua del medio intracelular se reduce la formación de cristales de hielo, por otro lado en la descongelación, podría dañarse la membrana, lo cual afectaría la rehidratación.

Los espermatozoides humanos son muy sensibles para tolerar altas concentraciones de crioprotectores convencionalmente usados. Las altas concentraciones de crioprotectores

permeables (30-50 %) causan efectos citotóxicos debido al estrés osmótico (Zou *et al* 2013). De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación seminal post-congelación, la adición de crioprotectores es un factor importante en el marcado deterioro de los parámetros. Zhang y col. observaron que la vitrificación de los espermatozoides sin crioprotectores es altamente significativa en la tasa de movilidad, después de la congelación (Zhang *et al* 2012).

Zhang y col. en el 2012 observaron que la tasa de recuperación de los móviles progresivos post-congelación tuvo una afectación estadísticamente positiva respecto a la concentración espermática, móviles progresivos y el porcentaje de la morfología normal. En diversos estudios han utilizado estrategias para la tasa de recuperación en los métodos de criopreservación, como el uso de crioprotectores, la regulación del tiempo de congelación, el sistema para guardar las muestras y las tasas de congelación y descongelación. Además de proporcionar sustancias como ácido-2-glucosido, vitamina E o evitar crioprotectores (Zhang *et al* 2012). En este trabajo empleamos dos técnicas de congelación, pensando que la rápida mostraría mejores resultados contra la convencional, confirmando dicha hipótesis.

Además del análisis de semen, la fragmentación espermática es una herramienta que proporciona información adicional específica acerca de la integridad del ADN espermático, en este trabajo al utilizar electroforesis unicelular en gel, encontramos que los espermatozoides poseen daño basal al ADN (cadena sencilla y cadena doble).

La fragmentación del ADN espermático es de gran importancia en la infertilidad y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia, en especial, cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida. Diversos estudios clínicos indican que el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN, esta significativamente correlacionado con la tasa de embarazo tanto *in vivo* como *in vitro*. Horta y colaboradores (2011) demuestran que la edad incrementa la fragmentación del ADN y va de la mano con la infertilidad. Smith y col. (2007) han mostrado que los espermatozoides maduros exhiben una alta tasa de daño en el ADN y más cuando hay condiciones patológicas que conducen a la infertilidad. En este estudio, el grupo de los pacientes fue el que presento los problemas anteriormente descritos, dando como resultado problemas de fertilidad, principalmente por el factor edad. Otro de los problemas conocidos en los espermatozoides maduros es el tiempo de abstinencia, ya que pasado un lapso de 3 a 5 días, los espermatozoides almacenados

comienzan a fragmentarse al activarse la apoptosis generándose un ambiente enzimático hostil para los nuevos espermatozoides, ya que al final de la espermiogénesis no existen mecanismos de reparación para los espermatozoides.

La espermatogénesis es un proceso complejo que envuelve la división mitótica y meiótica, con el objetivo de que las células germinales se dividan y se diferencien en un espermatozoide maduro. Si en el proceso de expansión rápida se rompe la cromatina se puede reparar, sin embargo, gran número de espermatozoides con fragmentación en el ADN se conservan así durante la eyaculación. La fragmentación puede ser consecuencia de la activación apoptótica abortiva, ya que se ve reflejado el rompimiento con la activación de las caspasas 3, 8 y 9 (Perrin *et al* 2013). Diversos estudios sobre la fragmentación del ADN y el porcentaje de apoptosis en los espermatozoides muestran un incremento significativo después de la congelación, posiblemente por ERO, causando daños en la cromatina (Zou *et al* 2013). En nuestro estudio, observamos que la congelación rápida conservo mejor a los espermatozoides, al comparar la congelación en distintos pH (Figura 21 y 22), observamos que en el pH 9 hay menos rompimiento de hebra doble, ya que el único grupo significativo fue el control positivo, en cambio en el pH 12.1 se muestra mayor fragmentación al sumarse los rompimientos de hebra simple. El control negativo y los donantes además de que muestran resultados parecidos entre sí (pH 9), no muestran daños significativos en comparación con los otros grupos a evaluar. En un estudio de Smith y col. evaluaron los niveles de antioxidantes, no mostraron diferencias significativas entre controles y pacientes, indicando que el daño al ADN ocurre antes de la espermiación, y la exposición prologada del epitelio seminífero a ERO, conduce a una disminución de la integridad de la cromatina en las células germinales testiculares (Smith *et al* 2007).

El H_2O_2 induce eventos apoptóticos, activando las caspasas 3 y 9 y externaliza la fosfatidilserina (Perrin *et al* 2013). En nuestro estudio es evidente que al tratar a los espermatozoides del control positivo con H_2O_2 , induce a un alto rompimiento de hebra simple y doble.

El estrés oxidante afecta directamente la integridad genómica de los espermatozoides induciendo entrecruzamientos de la cromatina, oxidación de bases nitrogenadas y rupturas de las hebras del ADN (Smith *et al* 2007). Al comparar la congelación convencional en distintos pH (Figura 23 y 24) encontramos que tanto pacientes como donantes muestran mayor incremento en la longitud del cometa, indicando que la

congelación convencional causo más rompimientos de hebra simple y doble. Espermatozoides que exhiben altos niveles de fragmentación en el ADN, conducen a pérdida embrionaria temprana, disminución de las tasas de embarazo, morbilidad de la descendencia, cáncer infantil, infertilidad, enfermedades genéticas causadas por mutaciones dominantes y enfermedades epigenéticas (Smith *et al* 2007).

El papel del estrés oxidante relacionado con la fragmentación del ADN es discutido, ya que provoca interacciones anormales entre el ADN espermático y las proteínas nucleares durante la criopreservación (Thomson *et al* 2008). Los espermatozoides con desbalance cromosómico pueden tener una alta capacidad para producir ERO, siendo más susceptibles al daño en el ADN ocasionado por estrés oxidante (Perrin *et al* 2013). Ribas y col. mediante ensayo cometa en condiciones neutras y alcalinas, relacionaron el rompimiento de hebra simple al estrés oxidante y el de hebra doble a la actividad de enzimas nucleares, indicando que el estrés oxidante puede activar a caspasas y endonucleasas en los espermatozoides. También observaron que en condiciones alcalinas hay más sensibilidad al rompimiento de hebra simple (Ribas *et al* 2012). En este estudio de igual forma, observamos más sensibilidad en el pH 12.1. En las Figuras 25 y 26, se muestra la diferencia de la congelación convencional y rápida respecto al mismo pH, donde los pacientes fueron estadísticamente significativos. En la Figura 27 se muestra la diferencia del pH 9 que es sensible al rompimiento de doble hebra, en contraste el pH 12.1 es sensible al rompimiento de cadena sensible y doble, mostrando que la congelación rápida conserva mejor el ADN, y que los donantes poseen mayor resistencia al daño que los pacientes. Kaltrur y col. (2008) vieron que la susceptibilidad de los espermatozoides con morfología anormal, junto con el ADN dañado, tenían efectos en la cromatina durante la congelación-descongelación, mostrando alta significancia en comparación con espermatozoides normales.

Expertos han indicado que la electroforesis unicelular en gel pH >13 es la más indicada al realizar estudios de genética toxicológica. Con pH mayor a 12 el ADN es desnaturalizado y desenrollado, ya que se rompen los puentes de hidrogeno que unen la doble hebra del ADN. A un pH >12.6, se observan los sitios álcali labil, además del rompimiento de hebra doble y sencilla; a pH >13 se tiene la máxima expresión de los rompimientos y los sitios álcali labil (Tice *et al* 2000). En nuestro estudio se utilizó pH 9 y 12.1, ya que era de nuestro interés observar los rompimientos de una hebra y de doble, silenciando los sitios álcali labil.

Sánchez 2016, al analizar por SCD muestras de donantes y pacientes criopreservadas por técnica convencional y rápida, obtuvo que los donantes de banco de semen presentan un excelente potencial fertilizante cuando obtuvieron un bajo índice de fragmentación de ADN post-congelación, por otro lado el mayor daño se encontró en muestras de pacientes con problemas de fertilidad. De acuerdo a nuestros resultados del índice de migración, encontramos que el grupo de los donantes para ambos tipos de congelación y pH se mostró homogéneo y sin diferencias significativas, clasificándose con daño bajo. En los pacientes la congelación convencional en ambos pH, fue la que registro el mayor daño, dejándonos ver la clara desventaja que tiene la congelación convencional contra la rápida.

IX. Conclusiones

Al realizar el análisis seminal de muestras de pacientes y donantes post-congelación, se encontró que la criopreservación afecta considerablemente los parámetros seminales de movilidad y vitalidad, independiente de la técnica de congelación utilizada.

La congelación rápida conservó en mayor proporción la integridad del ADN espermático mostrando menor daño de hebra simple y doble respecto a la congelación convencional. Además en el ADN el semen de donante mostró mayor integridad que el de los pacientes.

Tanto el análisis seminal como la electroforesis unicelular en gel son buenos indicadores para evaluar la calidad espermática de donantes y pacientes después de la congelación rápida y convencional.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Campos, L. G. y Dueñas Chacón, J. C., 2014. Correlación entre los parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático en varones atendidos en un centro de fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 31(1), pp. 44-52.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera edición ed. Barcelona. pp. 1100-1133.
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M. y Reguero, M. T., 2006. Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), pp. 291-300.
- Arena, E., Cambrón, A., Ambríz, D., Zúñiga, P. J. P. Rodríguez, A. y Rosado, A. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. 78: 5-11.
- Boitrelle, F., Albert, M., Theillac, C., Ferfour, F., Bergere, M., Vialard, F., Wainer, R., Bailly, M. y Selva, J. 2012. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin descondensation. *Journal of Andrology*. Vol. 33. No. 6.
- Bonde, J. P., Ernst, E., Jersen, T. K., Hjollund, N. H., Kolstad, H., Scheike, T., Giwercman, A. y Henriksen, B. 1998. Relation between semen quality and fertility: a population based study of 430 first-pregnancy planners. *THE LANCET*, 352(9135), pp. 1172-1177.
- Brugo-Olmedo, S., Chillik, C. y Kopelman, S. 2002. Definición y causas de la infertilidad. Vol. 54, N° 4, pp. 227-248.
- Cerezo-Parra, G., Castilla-Alcalá, G. y Rodríguez-Hernández, H. M., 2014. *Manual para el Análisis Básico de Semen*. México D. F: Editorial Parado S.A. de C.V.
- Cooper, T. G., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M. 2009. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Redroduction*, 16(3), pp. 231-245.
- Janson Cohen, B. & James Taylor, J., 2009. *El cuerpo humano. Salud y enfermedad*. Barcelona: s.n.

- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoquy, T. J., Overstreet, J. W. y Crowe, J. H., 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell-membranes – a demotration using sperm as a model. *J Exp Zool*; 265: 432-7.
- Espinosa-Rios, O., 2009. En: *Efecto de la criopreservación sobre la fragmentación de ADN en semen humano de donante*. Ciudad de México: UNAM, pp. 29-33.
- Esteves, S. C., Spaine, D. M., Cedenho, A. P. y Srougi, M., 2003. Effects of the technique of cryopreservation and dilution/centrifugation after thawing on the movility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. *Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 29(2), pp. 133-140.
- Fernández, A., del Carmen, M., Clavero, A., Ruiz de Asin, R., Zamora, S., Roldan, M., Rabelo, B., Ramirez, J. P., Yoldi, A., y Castilla, J. A., 2009. Fundamentos de criobiología espermatica para bancos de semen. ASEBIR, Volumen 14, pp. 17-25.
- Fox, S. I., 2014. Fisiología humana. 13ª edición. Mc Graw Hill Interamericana editores, S.A. de C. V.. Ciudad de Mexico. pp. 717.
- Fuller, B. y Paynter, S., 2004. Fundaments of cryobiology in reproductive medicine. *RBM on line*; 9: 680-91.
- Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M. y Tam P. P. L. 1998. Histone- and protamine-DNA association: Conservation of different patterns within the β -Globin domain in human sperm. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 18, N° 6, pp. 3350-3356.
- Gonsálvez, J., Cortés-Gutierrez, E., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Caballero, P. y Nuñez, R., 2009. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertility and Sterility*, 29(1), pp. 170-173.
- González-Marín, C., Gonsálvez, J. y Roy, R. 2012. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Internacional Journal of Molecular Sciences*. 13, 14026-14052.
- Griswold, M. D. & McLean, D., 2006. *Physiology of Reproduction*. tercera ed. St. Louis, MO: ELSEVIER.

- Haines, G., Marples, B., Daniel, P. y Morris, I., 1998. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Reproductive Toxicology*, Volumen 444, pp. 79-89.
- Hall, J. E. y Guyton, A. C. 2011. Tratado de fisiología médica. Berne y Levy Fisiología. 12^a Edición. Elsevier España S. L. Barcelona. Pp: 976.
- Halosperm, 2012. Médiación de la fragmentación del ADN espermático Compartiva de las técnicas disponibles. *Halotech DNA, S.L*, pp. 1-2, <http://www.halotechdna.com/wp-content/uploads/2014/10/IUhalosperm-eng.pdf>.
- Horta, F., Mdariaga, M., García, A., Hartel, S. y Smith R., 2011. Aumento del daño en el ADN espermático en varones mayores de 40 años. Santiago. Revista Médica de Chile, 139: 306-312.
- Cohen, B. J. & Taylor, J. J., 2009. *El cuerpo humano. Salud y enfermedad..* Barcelona: s.n.
- Jausoro, A., 2000. Reproducción Humana Asistida: Descripción de las opciones terapéuticas disponibles. Victoria-Gasteiz. Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco. Informe N°: Osteba E-00-05.
- Kalthur, G., Adiga, S. K., Upadhya, D., Roa, S. y Kumar, P. 2008. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril*. 89:1723-1727.
- Kerr, J. B., Loveland, K. L., O'Bryan, M. K. & de Kretser, D. M., 2006. *Physiology of Reproduction*. 3 ed. St. Louis. MO: ELSEVIER.
- Koeppen, B. M. y Stanton, B. A. 2009. Berne y Levy Fisiología. 6^a Edición. Elsevier España S. L. Barcelona. pp: 767.
- Kruger, T. F. y Coetzee, K. 1999. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Human Reproduction Update*. Vol 5, No. 2. pp.172-178.
- Kumar, D., Kalthur, G., Mascarenhas, C., Kumar, P. y Adiga, S. K. 2011. Ejaculated fractions of asthenozoospermic and teratozoospermic patients have differences in the sperm DNA in tegrity. *Journal of Andrology*. 43: 416-421.

- Land, J. A. y Evers J. L. H. 2003. Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. *Human Reproduction*. Vol. 18. No 2. pp: 455-467.
- Lee, C. Y., Lee. C. T., Wu, C. H., Hsu, C. S. y Hsu, M. I. 2010. Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa. *Journal of Andrology*. 44:81-86.
- Lim, J. J., Shin, T. E., Song, S. H., Bak, C. W., Yoon, T. K. y Lee, D. R. 2010. Effect of liquid nitrogen vapor storage on the motility, viability, morphology, deoxyribonucleic acid integrity, and mitochondrial potential of frozen-thawed human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. Vol. 94, No. 7.
- Mazur, P., 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*; 47: 347-69.
- Mazur, P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 14: 251-72.
- Morales, R., Llédó, B., Ortiz, J. A., Rodríguez-Armedo, D., Febregat, A. y Bernabeu, R., 2007. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 24(5), pp. 305-313.
- Morris, G. J., Acton, E., Murray, B. J. y Fonseca, F., 2012. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Elsevier*, Volumen 64, pp. 71-80.
- Nason, A., 1983. *Biología*. 21ª edición. Editorial Limusa, S.A., Ciudad de México. pp. 636
- Nawal, A. y Ghizlane, M., 2014. Physiology of the Hypothalamic-Pituitary-Testicular complex: a view by stage in the light of recent advance. *Journal of Endocrinology and Diabetes Mellitus*, 2, pp. 33-38.
- Nei, T., 1978. Structure and function of frozen cells: freezing patterns and post-thaw survival. *J Microsc*; (2): 197-204.
- Nijs, M., De Jonge, C., Cox, A., Janssen, M., Bosmans, E. y Ombelet, W. 2011. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology, *Journal of Andrology*, 43: 174-179.

- Nuñez, R., Cortés, S., Gago, M., Pueyo, Á., Peramo, M. y Caballero, P. 2007. Análisis microbiológico del semen de los varones en estudio de infertilidad. Madrid. *Revista Internacional de Andrología*. 5(3).
- Olivera, M., Ruiz, T., Terazona, A. y Giraldo, C., 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, Vol. 19;4: 426-436.
- Perrin, A., Nguyen, M. H., Bujan, L., Vialard, F., Amice, V., Guéganic, N., Douet-Guilbert, N., De Braekeleer, M. 2013. DNA fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement. *Journal of Andrology*. 1:632-638.
- Raheem, A. A. y Ralph, D., 2011. Male infertility: causes and investigations. *Trends in Urology & Men's Health*. pp. 8-11.
- Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida (Red LARA). Estado actual de la reproducción asistida en Latinoamérica y el mundo. <http://redlara.com/>.
- Remohí, J., Cobo, A., Romero, J., de los Santos, M. J, y Pellicer, A., 2008. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. pp. 47-49.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J. y Benet, J. 2012. Alkaline and neutral comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Human reproduction*. Vol. 27. No. 3. pp. 652-658.
- Rodríguez-Mercado, J. J., Mateos-Nava, R, A. y Altamirano-Lozano, M. A. 2011. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides in vitro. *Elsevier Science*. 25 (2011) 1996-2002.
- Rosas, M. R., 2007. Infertilidad masculina Causas, diagnóstico y tratamiento.. *OFFARM*, 26(7), pp. 70-75.
- Rydberg, K. J. y Johanson, K. J. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, in: PC. Hanwalt, E. C. Friedberg (EDS.), *DNA Repair Mechanisms*, Academic Press, New York. Pp. 465-468.
- Sakkas, D. y Alvarez, J. G., 2010. Sperm DNA fragmentacion: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility Steril*, pp. 1-10.

- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P. G. y Bianchi, U. 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Journals of Reproduction and Fertility*. N° 4, 31-37.
- Saladin, K. S., 2013. En: *Anat3mia Fisiolog3a*. s.l.:Mc Graw-Hill Interamericana Editores S. A. de C. V., pp. 1035-1055..
- S3nchez, J. O. 2016. Determinaci3n de la fragmentaci3n del ADN esperm3tico y apoptosis en semen congelado de donantes de banco de semen y pacientes inf3rtil es por las t3cnicas de congelaci3n rapida y convencional. Ciudad de M3xico. UNAM, pp. 105-116.
- Satirapod, C., Treetampinich, C., Weerakiet, S., Wongkularb, A., Rattanasiri, S. y Choktanasiri, W. 2011. Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Journal of Andrology*. 44, 786-790.
- Schagdarsurengin, U., Paradowska, A. y Steger K., 2012. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction, *Nature Reviews Urology*, Vol. 9, pp. 609-619.
- Sedglach, J., 2014. Evaluaci3n de la utilidad del 3ndice de fragmentaci3n esperm3tica de ADN en la reproducci3n asistida. Universidad Nacional Aut3noma de M3xico. Ciudad de M3xico.
- Singh, N. P., 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Elsevier Science*, Volumen 455, pp. 111-127.
- Smith, R., Kaune, H., Parodi, D., Madariaga, M., Morales, I., Rios, R. u Castro, A. 2007. Aumento del da3o en el ADN y estr3s oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idi3patica y antecedentes de criptorquidismo. *Revista M3dica de Chile*. 135: 279-286.
- Stocco, D. M. y McPhaul, M. J. Physiology of testicular steroidogenesis. In: Knobil, E. y Neill, J. D. Editors *The physiology of reproduction*. 3. New York, NY: Raven Press; 2006. Pp. 979-994.
- Thomson, L. k., Fleming, S, D., Schulke, L., Barone, K., Zieschang, J. A. y Clark, A. M. 2008. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used

but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. *Fertility and Sterility*. Vol. 92, No. 3.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. y Sasaki, F. Y. 2000. Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for *In vitro* and *vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.

Tice, R. y Vasquez, M., 1999. Protocol for the Application of the pH>13 Alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Carolina del Norte, pp. 1-8.

Tresguerres J. A., Ariznavarreta, C., y Alfaro, V., 2010. *Fisiología humana*. México: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S. A. de C. V.

Velázquez-Conejo, G. 2009. Fisiología de la reproducción humana. *Rev Mex Med Rep*; 1: 115-130.

Vazquez, J. R. 2012. Fragmentación del ADN de espermatozoides y donantes de banco de semen: Efecto de la criopreservación. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

WHO, 2010. *Laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. Suiza: 5ta edición.

Zhang, X., Zhou, Y., Xia, W., Wu, H., Yao, K., Liu, H. y Xiong, C. 2012. Effect of pre-freezing conditions on the progressive motility recovery rate of human frozen spermatozoa. *Journal of Andrology*. (44): 343-348.

Zou, Y., Yin, T., Chen, S., Yang, J. y Huang, W. 2013. On-chip cryopreservation: A novel method for ultra-rapid cryoprotectant-free cryopreservation of small amounts of human spermatozoa. *Plos One*. Vol:8, pp: 1-7.