



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio comparativo de parámetros de fertilidad en
espermatozoides de humano vitrificados, en presencia y
ausencia de antioxidante EmbryoORP®, y congelados
lentamente**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CÉSAR RODRIGO CORIA GÓMEZ

Directora de Tesis:

DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ

Ciudad Universitaria, CD. MX.

2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos del Jurado

| | |
|---|---|
| 1. Datos del alumno | 1. Datos del alumno |
| Apellido paterno | Coria |
| Apellido materno | Gómez |
| Nombres(s) | César Rodrigo |
| Teléfono | 56 10 79 31 |
| Universidad Nacional Autónoma de México | Universidad Nacional Autónoma de México |
| Facultad de Ciencias | Facultad de Ciencias |
| Carrera | Biología |
| Número de cuenta | 416051872 |
| 2. Datos del tutor | 2. Datos del tutor |
| Grado | Dra |
| Nombres(s) | Claudia Lydia |
| Apellido paterno | Treviño |
| Apellido materno | Santa Cruz |
| 3. Datos del sinodal 1 | 3. Datos del sinodal 1 |
| Grado | Dra |
| Nombres(s) | María del Carmen |
| Apellido paterno | Miñana |
| Apellido materno | Solís |
| 4. Datos del sinodal 2 | 4. Datos del sinodal 2 |
| Grado | M en C |
| Nombres(s) | Laura Silvia |
| Apellido paterno | Salinas |
| Apellido materno | Velázquez |
| 5. Datos del sinodal 3 | 5. Datos del sinodal 3 |
| Grado | Dr |
| Nombres(s) | Julio César |
| Apellido paterno | Chávez |
| Apellido materno | Zamora |
| 6. Datos de sinodal 4 | 6. Datos de sinodal 4 |
| Grado | M en C |
| Nombres(s) | Paulina |
| Apellido paterno | Torres |
| Apellido materno | Rodríguez |
| 7. Datos del trabajo escrito | 7. Datos de trabajo escrito |
| Título | Estudio comparativo de parámetros de fertilidad en espermatozoides humano vitrificados en presencia y ausencia de antioxidante EmbryoORP, y congelados lentamente |
| Número de paginas | 90 |
| Año | 2019 |

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del “Consortio de la Fisiología del Espermatozoide” del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Cuernavaca, México), bajo la asesoría de la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz. Para la realización de la tesis se recibió financiamiento por parte de Centro de Innovación Tecnológica y Medicina Reproductiva (CITMER) y del donativo DGAPA-PAPIIT IN202519.

AGRADECIMIENTO ACADÉMICOS

- A mi tutora, la **Dra. Claudia L. Treviño Santa Cruz**, por la vocación que le caracteriza en el quehacer de la ciencia y docencia. Gracias por su tutela en el desarrollo de este proyecto y su apoyo incondicional fuera y dentro del laboratorio. Por confiar en mí y brindarme todas las oportunidades posibles.
- A la asesoría que me brindo la **M. en C. Paulina Torres Rodríguez**, por instruirme desde mis primeros minutos en el laboratorio. Gracias por su apoyo y consejos que fueron esenciales para la elaboración de este trabajo, al igual que en mi labor científica.
- A la asesoría y apoyo de el **Biol. Israel Maldonado** y de el **T.L.C Israel Jiménez**, por confiar en mí y darme las herramientas para la elaboración de este proyecto.
- A los doctores miembros del consorcio de fisiología del espermatozoide: **Alberto Darszon, Takuya Nishigaki, Carmen Beltrán, Ignacio López**, por sus conocimientos, apoyo y retroalimentación.
- A la asesoría técnica de los miembros del Consorcio de Fisiología del Espermatozoide: **Biol. José Luis de la Vega Beltrán** y **M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara**. Por su excepcional ayuda y disposición para la utilización del equipo y material del laboratorio que fue crucial para el desarrollo del trabajo.
- A la **Biol. Erika Isabel Melchy Pérez** por su apoyo y asesoría en los experimentos de citometría de flujo.
- A la **Dra. Lina Villar** por participar en mi comité tutorial y compartirme su experiencia y consejos para la elaboración de este trabajo.
- A la **M. en C. Laura Silvia Salina Velázquez**, al **Dr. Julio César Chávez** y a la **Dra. María del Carmen Miñana Solía** por su apoyo y consejos en el desarrollo final para el escrito de este trabajo, y por formar parte de mi comité sinodal.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Gracias a mi madre **Emilia Patricia Gómez Bravo** por ser la principal promotora de mis sueños, gracias a ella por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas. Por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio, agotadoras noches en las que su compañía y la llegada de sus cafés era para mí como agua en el desierto. Gracias por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida. Gracias por cada consejo y por cada una de las palabras que me guiaron durante mi vida.

Gracias a mi hermana, **Esveida Paulina Coria Gómez** una de las mujeres que más quiero en este mundo. Tu cariño, tu amor, y tus grandes manifestaciones de afecto, son una gran bendición, que da muestra de lo que nuestra familia tiene para ofrecer. Muchas gracias por ser mi constante motivación y ayudarme a concluir con mi carrera.

Por su apoyo incondicional, sus consejos, afecto y cariño durante toda mi vida, a mis tíos **Ing. Jorge Gómez Bravo** y la **Dra. Guadalupe Ortiz**, y a mis padrinos **Lic. Aurelio Rico Cortés** y **Lic. Cecilia Imelda Mendoza Morales**.

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer es afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento; cada investigación, proceso, y proyectos que se realizaron dentro de esta, lo disfruté mucho, y no fue porque simplemente me dispuse a que así fuera, fue porque mis amigos siempre estuvieron ahí.

Gracias a mi universidad, por haberme permitido formarme en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, gracias a todos ustedes. Fueron ustedes los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se ve reflejado en la culminación de mi paso por la universidad.

I. ÍNDICE

| | | |
|----------|---|----|
| I. | Índice..... | 6 |
| II. | Índice de figuras..... | 8 |
| III. | Abreviaturas..... | 10 |
| IV. | Resumen..... | 11 |
| 1. | Capítulo I: Introducción..... | 13 |
| 1.1. | Planteamiento del problema..... | 13 |
| 1.1.1. | Infertilidad..... | 13 |
| 1.1.2. | Reproducción asistida..... | 15 |
| 1.1.3. | Importancia médica..... | 16 |
| 1.1.4. | Importancia industrial y económica..... | 17 |
| 1.2. | Antecedentes..... | 18 |
| 1.3. | Marco teórico..... | 24 |
| 1.3.1. | El espermatozoide..... | 24 |
| 1.3.2. | Motilidad, vitalidad, morfología y concentración..... | 25 |
| 1.3.3. | El papel del pH en el espermatozoide..... | 28 |
| 1.3.4. | Capacitación..... | 28 |
| 1.3.5. | El acrosoma y la reacción acrosomal..... | 29 |
| 1.3.6. | La mitocondria y el potencial de membrana mitocondrial..... | 30 |
| 1.3.7. | Potencial de óxido reducción..... | 31 |
| 2. | Capítulo II: Justificación..... | 33 |
| 3. | Capítulo III: Hipótesis..... | 34 |
| 4. | Capítulo IV: Objetivos..... | 35 |
| 4.1. | Objetivo general..... | 35 |
| 4.2. | Objetivos particulares..... | 35 |
| 5. | Capítulo V: Materiales y métodos..... | 36 |
| 5.1. | Estrategia general..... | 36 |
| 5.2. | Estrategia particular..... | 37 |
| 5.2.1. | Muestras biológicas..... | 38 |
| 5.2.2. | Vitrificación y desvitrificación..... | 38 |
| 5.2.3. | Congelación lenta y descongelación..... | 39 |
| 5.2.4. | Equipos..... | 40 |
| 5.2.4.1. | LensHooke®..... | 40 |
| 5.2.4.2. | Computer aided semen analysis (CASA)..... | 41 |
| 5.2.4.3. | MiOXSYS®..... | 41 |
| 5.2.4.4. | Citometro de flujo..... | 41 |
| 6. | Capítulo VI: Resultados..... | 43 |
| 6.1. | Motilidad..... | 43 |
| 6.1.1. | CASA..... | 43 |
| 6.1.2. | LensHooke®..... | 45 |
| 6.2. | Vitalidad..... | 47 |
| 6.2.1. | CASA..... | 47 |
| 6.2.2. | Citometría..... | 48 |
| 6.3. | Concentración..... | 49 |

| | |
|---|----|
| 6.3.1. CASA..... | 49 |
| 6.3.2. LensHooke®..... | 50 |
| 6.4. Morfología..... | 51 |
| 6.5. pH..... | 52 |
| 6.6. Potencial de óxido-reducción..... | 53 |
| 6.7. Reacción acrosomal..... | 54 |
| 6.8. Potencial de membrana mitocondrial..... | 55 |
| 7. Capítulo VII: Discusión..... | 56 |
| 8. Capítulo VIII: Conclusiones..... | 60 |
| 9. Capítulo IX: Perspectivas..... | 61 |
| 10. Capítulo X: Literatura citada..... | 63 |
| V. Apéndices..... | 79 |
| 1. Curvas de titulación..... | 79 |
| 1.1. Vitalidad..... | 79 |
| 1.1.1. Separación por <i>swim-up</i> | 79 |
| 1.1.2. Tinción con Hoechst 33342 e yoduro de propidio..... | 79 |
| 1.1.3. Evaluación de la vitalidad por CASA..... | 80 |
| 1.2. Reacción acrosomal..... | 81 |
| 1.2.1. Capacitación..... | 81 |
| 1.2.2. Inducción de la reacción acrosomal..... | 81 |
| 1.2.3. Tinción con FITC-PSA..... | 81 |
| 1.2.4. Interpretación de datos..... | 81 |
| 1.2.5. Evaluación del estado del acrosoma..... | 82 |
| 1.3. Potencial de membrana mitocondrial..... | 87 |
| 1.3.1. Tinción con JC-1..... | 87 |
| 1.3.2. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial..... | 87 |
| 2. Apéndice de tablas..... | 90 |
| 3. Imágenes suplementarias..... | 92 |
| 3.1. Controles para reacción acrosomal..... | 92 |
| 3.2. Control de CCCP para potencial de membrana mitocondrial..... | 92 |

II. Índice de figuras y tablas

| | |
|--|----|
| Figura 1: “Número de parejas incapaces de tener hijos entre los años 1990 y 2010 en 190 países..... | 14 |
| Figura 2: “Infertilidad a nivel mundial en parejas en edad reproductiva para el año 2010..... | 14 |
| Figura 3: “Técnicas más comunes de reproducción asistida”..... | 16 |
| Figura 4: “Esquema de los sucesos físicos que ocurren durante el enfriamiento”..... | 22 |
| Figura 5: “Representación esquemática de un espermatozoide madura de humano con sus componentes estructurales”..... | 25 |
| Figura 6: “Motilidad y batido flagelar de espermatozoides no capacitados y capacitados”..... | 26 |
| Figura 7: “Morfología del espermatozoide”..... | 27 |
| Figura 8: “Reacción del acrosoma humano”..... | 29 |
| Figura 9: “Estructura de la mitocondria”..... | 30 |
| Figura 10: “La presencia de EmbryORP® no mejora la motilidad progresiva en comparación a la vitrificación sin antioxidante y la congelación lenta”..... | 45 |
| Figura 11: “La presencia de EmbryORP® no mejora la motilidad no progresiva en comparación a la congelación lenta”..... | 45 |
| Figura 12: “La presencia de EmbryORP® no mejora la motilidad total de los en comparación a la congelación lenta”..... | 45 |
| Figura 13: “La presencia de EmbryORP® no mejora la motilidad progresiva de espermatozoides vitrificados”..... | 46 |
| Figura 14: “La presencia de EmbryORP® no mejora la motilidad no progresiva de espermatozoides vitrificados”..... | 47 |
| Figura 15: “La presencia de EmbryORP® no mejora la motilidad progresiva de espermatozoides vitrificados”..... | 47 |
| Figura 16: “La congelación lenta tiene como resultado un mayor porcentaje de vitalidad que la vitrificación en presencia o ausencia de EmbryORP®”..... | 48 |
| Figura 17: “La congelación lenta y la vitrificación sin antioxidante tienen como resultado espermatozoides con un mayor porcentaje de vitalidad que la vitrificación en presencia de EmbryORP®”..... | 48 |
| Figura 18: “La concentración de espermatozoides se ve disminuida después del proceso de congelación”..... | 49 |
| Figura 19: “La presencia de antioxidante no afecta la concentración espermática después de la congelación”..... | 49 |
| Figura 20: “La concentración de espermatozoides se ve disminuida después del proceso de congelación”..... | 50 |
| Figura 21: “La presencia de EmbryORP® no afecta la concentración espermática después de la congelación..... | 51 |

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

| | |
|---|----|
| Figura 22: “Existe un mayor número de espermatozoides con morfología óptima después de la criopreservación en ausencia de antioxidante”..... | 51 |
| Figura 23. Fotografías representativas tomadas por el LensHooke® para determinar la morfología de los espermatozoides..... | 52 |
| Figura 24: “La presencia de EmbryORP® reduce el pH del medio una vez desvitrificados los espermatozoides”..... | 53 |
| Figura 25: “El ORP de espermatozoides posterior a la criopreservación se ve disminuido en presencia de EmbryORP”..... | 54 |
| Figura 26: “El antioxidante EmbryORP® preserva mejor el acrosoma de espermatozoides posterior a la criopreservación”..... | 54 |
| Figura 27: “El antioxidante EmbryORP® disminuye el PMM de espermatozoides posterior a la criopreservación”..... | 55 |
| Figura 28: “La morfología de los espermatozoides no se ve afectada por la presencia de EmbryORP®”..... | 60 |
| Figura 29: “Comparación entre dos concentraciones diferentes de Hoechst 33342 y yoduro de propidio para observar la vitalidad de los espermatozoides por microscopia..... | 80 |
| Figura 30: “Experimento representativo de la interpretación de los resultados, previa al análisis de fluorescencia”..... | 82 |
| Figura 31: “Experimento representativo de medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos teñidos con diferente concentración de FITC PSA”..... | 83 |
| Figura 32: “Experimento representativo de medición por citometría de flujo de la vitalidad de espermatozoides con PI”..... | 83 |
| Figura 33: “Gráfica de puntos de la medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos con A23187 y teñidos con distintas concentraciones de FITC PSA”..... | 84 |
| Figura 34: “Experimento representativo de medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos con A23187 y teñidos con 1µ de FITC PSA”..... | 85 |
| Figura 35: “Experimento representativo de medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos con progesterona e ionomicina teñidos con 1µg de FITC-PSA”..... | 86 |
| Figura 36: “Experimento representativo de medición por citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides teñidos con JC-1”..... | 88 |
| Figura 37: “Experimento representativo de medición por citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides teñidos con JC-1, CCCP y nicotinamida como controles negativos y positivos respectivamente”..... | 89 |
| Figura 38: “Porcentaje de reacción acrosomal espontánea e inducida por ionomicina en espermatozoides después de la criopreservación”..... | 92 |

| | |
|---|----|
| Figura 39: “Disminución del PMM en espermatozoides después de la criopreservación ante la adición de CCCP” | 92 |
| Tabla 1: “Agentes crioprotectores más utilizados distinguidos por su naturaleza bioquímica..... | 19 |
| Tabla 2: “Descripción de los fluorocromos utilizados para las mediciones de RA y PMM”..... | 42 |
| Tabla 3: Prueba estadística utilizada para cada uno de los parámetros evaluados con significancia de $p < 0.05$ | 43 |
| Tabla 4: “Promedio de las dimensiones de la cabeza y la cola de los espermatozoides (μm) después de la vitrificación en presencia y ausencia de antioxidante EmbryoORP [®] comparado con el valor establecido por la OMS..... | 60 |
| Tabla 5: “Reactivos utilizados para el ensayo de vitalidad”..... | 89 |
| Tabla 6: “Reactivos utilizados para el ensayo de reacción acrosomal en citometría..... | 90 |
| Tabla 7: “Reactivos para el ensayo de potencial de membrana mitocondrial”..... | 91 |
| Tabla 8 : “Medios utilizados”..... | 91 |
| Esquema 1: “Estrategia general del proyecto”..... | 36 |
| Esquema 2: “Estrategia particular del proyecto”..... | 37 |

III. Abreviaturas

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| ACP | Agentes crioprotectores |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| Ca²⁺ | Ion calcio |
| CAT | Catalasa |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| FSC | Dispersión frontal |
| FITC | Fluoresceína conjugada |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| HTF | Fluido tubárico humano |
| MNP | Motilidad no progresiva |
| MPR | Motilidad progresiva |
| NAD⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ORP | Potencial de óxido-reducción |
| PI | Yoduro de propidio |
| PMM | Potencial de membrana mitocondrial |
| RA | Reacción acrosomal |
| ROS | Especies de oxígeno reactivas |
| SSC | Dispersión lateral |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| TRA | Técnicas de reproducción asistida |

IV. Resumen

La infertilidad es problema crítico a nivel mundial causado por la combinación multifactorial donde destaca el estilo de vida de las personas, las predisposiciones genéticas, hormonales, alteraciones y malformaciones anatómicas, así como un amplio abanico de medicamentos y enfermedades.

El problema de infertilidad tanto en hombres como en mujeres ha dado pauta a técnicas de reproducción asistida que se caracterizan por la actuación directa sobre los gametos, con el fin de favorecer la fecundación y la transferencia, o depósito de embriones en la cavidad uterina. Estas técnicas se apoyan de la criopreservación de ovocitos y espermatozoides para preservar la fertilidad.

La criopreservación de gametos, puntualmente de espermatozoides tiene como propósito fundamental preservar la fertilidad masculina y garantizar la capacidad fecundante de la célula. Sin embargo, las técnicas actuales de preservación han mostrado lesiones en la estructura y función de los espermatozoides ante el choque osmótico ejercido durante el descenso de la temperatura y, la producción de especies reactivas de oxígeno.

Debido al alto potencial biomédico de la criopreservación de espermatozoides humanos, se comparó el método de vitrificación con y sin antioxidante novedoso llamado EmbryoORP® y la congelación lenta sobre ocho parámetros de fertilidad: motilidad, vitalidad, morfología, concentración, pH del medio externo, potencial de óxido reducción, reacción acrosomal y potencial de membrana mitocondrial para contestar la pregunta si la presencia del antioxidante, mitigaba el daño criogénico celular frecuentemente observado durante el evento de criopreservación.

Para vitrificar se utilizó el kit Easy-Sperm[®] (iGLS, Alicante, España) en presencia y ausencia de medio antioxidante EmbryoORP[®] y el TEST yOLK Buffer-Irvine Scientific como medio para la congelación lenta, todos proporcionados por Citmer, México.

Se trabajó con 20 muestras de espermatozoides humanos haciendo uso de las siguientes técnicas: *Computer-assisted sperm analysis* (CASA) para calcular la motilidad, y la concentración, citometría de flujo para evaluar el estado del acrosoma y potencial de membrana mitocondrial, y la vitalidad de las células por ambos métodos. También se empleó el equipo LensHooke[®] para estimar la motilidad, concentración, pH y morfología. Finalmente se utilizó el sistema MiOXSYS[®] para medir el potencial de óxido reducción. Ambos equipos proporcionados por Citmer, México.

Se observó que el antioxidante EmbryoORP[®] durante la vitrificación disminuye de forma significativa el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides, afectando el balance de especies reactivas de oxígeno. Esto repercute en la baja motilidad, vitalidad y morfología, pero mejor conservación del acrosoma. La congelación lenta aportó mejor motilidad y vitalidad a las células, sin embargo la concentración y morfología en relación con la vitrificación sin suplemento fue menor.

Se concluyó que el antioxidante logra bajar el potencial de óxido reducción, pero a niveles subóptimos que son perjudiciales para el espermatozoide. Por lo que se recomienda disminuir su concentración o poder antioxidante.

Capítulo I

Introducción

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. *Infertilidad*

La infertilidad es problema crítico a nivel mundial (Mascarenhas *et al.*, 2012), definido por la Organización Mundial de la Salud como la enfermedad del sistema reproductivo, que consiste en la imposibilidad de lograr el embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección (Cooper *et al.*, 2010). Las causas de la infertilidad varían entre las parejas y puede darse, bajo la combinación multifactorial donde destaca el estilo de vida, las predisposiciones genéticas, hormonales, alteraciones y malformaciones anatómicas, así como un amplio abanico de medicamentos y enfermedades (Brugo-Olmedo *et al.*, 2003; Rojas-Quintana *et al.*, 2011; Generoso-Marroquino, 2016).

Mascarenhas y colaboradores (2012) realizaron el estudio donde comparan las tasas de infertilidad de mujeres en edad reproductiva, en 190 países entre los años 1990 y 2010. Reportaron el incremento de 6.5 millones de mujeres que tienen dificultad para concebir el primer o segundo hijo, principalmente en países occidentales de primer mundo (**Figura 1** y **Figura 2**). Dicho estudio no abarca la infertilidad masculina a pesar de evidencias en la disminución de la calidad del semen, probablemente, a causa del incremento en enfermedades como cáncer testicular, criptorquidia (descenso incompleto de uno o ambos testículos) e hipospadia (defecto en la apertura de la uretra localizada en la parte inferior del

pene) (Carlsen *et al.*, 1992; Velde *et al.*, 2010). Este problema de infertilidad ha dado pauta a técnicas de reproducción asistida.

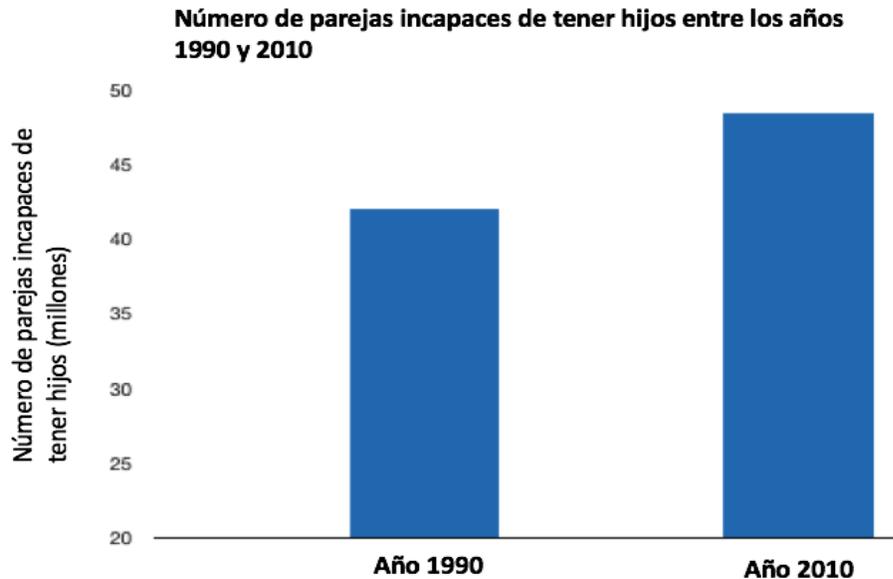


Figura 1. **Número de parejas incapaces de tener hijos entre los años 1990 y 2010 en 190 países.** En 1990 se reportó el total de 42 millones de parejas con infertilidad y en 2010 48.5 millones. La prevalencia de infertilidad fue más alta en Asia meridional, África subsahariana, África del Norte/ Medio Oriente y Europa Central/oriental y Asia Central. Modificado de Mascarenhas *et al.*, 2012.

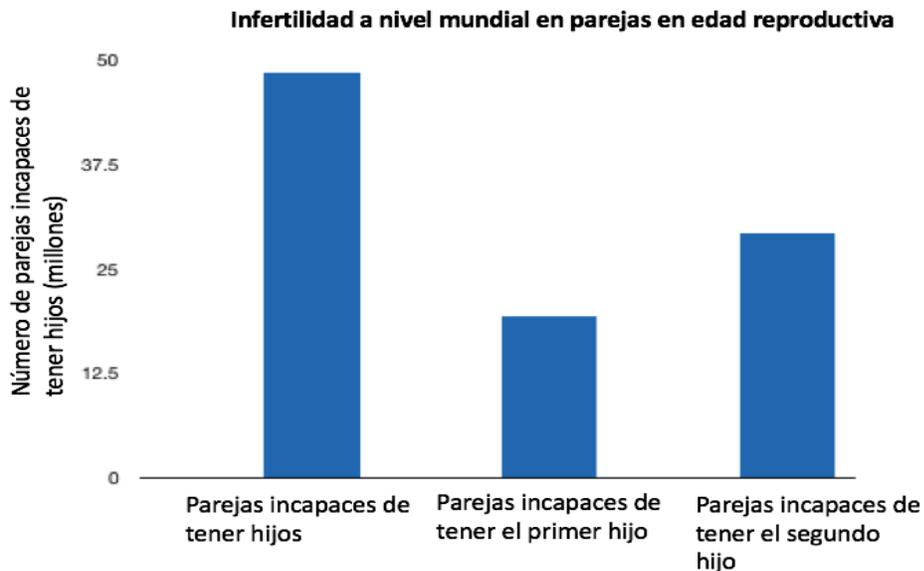
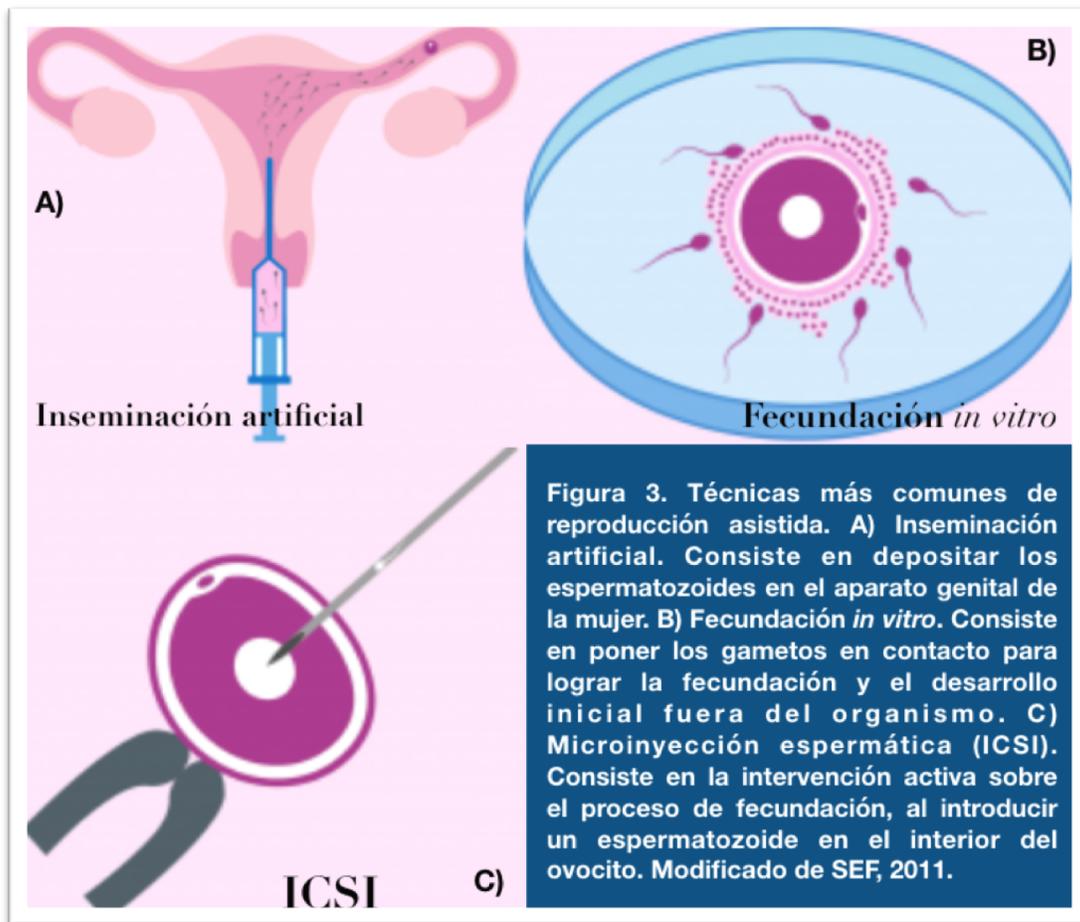


Figura 2. **Infertilidad a nivel mundial en parejas en edad reproductiva para el año 2010.** Se muestra el total de parejas incapaces de tener hijos, número de las que no pueden tener el primer hijo y las incapaces de concebir el segundo hijo. Total de parejas que fueron incapaces de tener hijos: 48.5 millones. Parejas incapaces de tener el primer hijo: 19.2 millones. Parejas incapaces de tener el segundo hijo: 29.3 millones. En 2010 1.9% de mujeres no pudieron tener un nacimiento vivo (infertilidad primaria) y el 10.5% no pudieron tener otro hijo (infertilidad secundaria). Modificado de Mascarenhas *et al.*, 2012.

1.2.2. *Reproducción asistida*

El empeño en preservar los gametos es importante para la conservación de especies, la medicina clínica y las técnicas de reproducción asistida (TRA) (Barbas & Mascarenhas, 2009). Estas últimas se definen como: el conjunto de estrategias caracterizadas por la actuación directa sobre los gametos con el fin de favorecer la fecundación y la transferencia, o depósito de embriones en la cavidad uterina (SEF, 2011). Dentro de las prácticas más comunes en humanos se encuentra la inseminación artificial con semen de la pareja (IAC), la inseminación artificial con semen de donante (IAD), la fecundación *in vitro* (FIV) y la microinyección espermática (ICSI) (Figura 3) (Jausoro, 2005; SEF, 2011).

En los últimos años se ha detectado un incremento en la tasa de uso de estas técnicas por mujeres que buscan concebir un hijo, particularmente, aquellas que lo han pospuesto por cuestiones personales y/o profesionales (Kupka *et al.*, 2014). En España, este incremento ha tenido repercusiones económicas, donde se atribuyen ganancias de 530 millones de euros sólo en el 2016 por el alto número de clínicas, centros y hospitales con atención reproductiva. Es importante mencionar que España concentra más del 40% del turismo reproductivo en Europa (Caldentey, 2017).



1.1.3. Importancia médica

La reproducción asistida no se encuentra limitada a mujeres que buscan posponer el deseo de ser madres, sino también para hombres y mujeres que tienen algún problema de fertilidad o que podrían tenerlo en el futuro. De seis millones de parejas a nivel mundial con problemas de infertilidad, casi el 30% de los casos se atribuye a complicaciones en el gameto masculino (Brugh & Lipshultz, 2004).

La preservación de fertilidad para pacientes oncológicos es otro ejemplo de la importancia médica de las TRA por el efecto dañino de radio y quimioterapias que pueden destruir tanto las células gaméticas como las somáticas (Porcu *et al.*, 2004; Wallace *et al.*, 2005; Meseguer *et al.*, 2006). Se ha reportado que hombres sobrevivientes de cáncer presentan baja calidad seminal, la cual puede ser de carácter transitorio o definitivo. La

gravedad depende del tipo de cáncer, el tratamiento recibido y la calidad seminal previa (Mendoza *et al.*, 2003). Sin embargo, en muchos casos, la infertilidad es sorpresa para los pacientes que padecieron cáncer en la infancia, ya que no fueron advertidos en el momento o no contemplaron las consecuencias y los riesgos de su tratamiento (Zebrack *et al.*, 2004).

La preservación de espermatozoides y óvulos para pacientes con cáncer puede ser crítico si desean formar familia en el futuro. Aunque no se ha reportado que daños por estos tratamientos que repercutan en hijos con deficiencias o trastornos (Senturia *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1991; Garsi *et al.*, 2009), la fertilidad se ve reducida por daños al ácido desoxirribonucleico (ADN) en los gametos de ambos sexos por efectos de la radiación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Blanpain *et al.*, 2011; Brent, 2014). Es imperativo, encontrar prácticas para salvaguardar y mantener la viabilidad de estas células.

1.1.4. Importancia industrial y económica

Los distintos sectores en la producción de alimento (ganadería y piscicultura), veterinario, al igual que grupos ecuestres están interesados en la preservación de aquellos ejemplares de alta estima, a través de técnicas criogénicas (Restrepo-Betancur *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2014; Berrios *et al.*, 2010; Restrepo-Betancur *et al.*, 2016; Ugarelli *et al.*, 2017). Gracias a los bajos costos de transporte, la criopreservación de espermatozoides asegura la futura producción (Sieme *et al.*, 2015), previene infecciones genitales transmitidas por vía natural y asegura el éxito en la prevalencia de genes valiosos que atribuyen una característica que se desea mantener en la población (Pesch & Hofmann, 2007).

Sólo en Estados Unidos, la inseminación artificial fue trascendental para la industria lechera, que para el 2004, 70% del ganado se criaba bajo esta práctica. Desde su implementación la población de ganado lechero declinó de 25.6 millones de cabezas, a 9.2 millones sin menoscabo de la producción, gracias a la selección artificial de las mejores

productoras de leche (DeJarnette, 2004). De igual forma, se estima que 100% de los pavos y 70% de los porcinos en Estados Unidos se crían por inseminación artificial (Graham, 2008).

Se puede resaltar un área más con alto potencial en la criopreservación de gametos: la conservación de especies en peligro de extinción. Gracias a los avances biotecnológicos y técnicas de reproducción asistida es posible seleccionar células óptimas para asegurar la diversidad genética (Andrabi & Maxwell, 2007). Uno de los problemas para estas especies es el aislamiento en pequeñas poblaciones como resultado de la fragmentación del hábitat. Esto impide el flujo genético entre los individuos y lleva a la endogamia (Baena & Halffter, 2008). La preservación de espermatozoides y de células vivas de estos animales puede salvaguardar su futuro, como el caso de España donde en 2005, nació la primera gacela africana mediante inseminación artificial con semen congelado (Fernández-Muerza, 2010). Es importante aclarar que no es opinión del autor de este trabajo ni del Consorcio de la Fisiología del Espermatozoide como grupo, que la criopreservación sea la solución al problema de extinción que se vive actualmente, sino representa apoyo a esta cuestión.

A pesar de su amplio campo de trabajo, se acotó la problemática existente en la criopreservación únicamente a espermatozoides humanos, ante la necesidad de encontrar técnicas que permitan salvaguardar la fertilidad.

1.2. Antecedentes

La criopreservación de gametos, puntualmente espermatozoides, tiene como propósito fundamental preservar la fertilidad masculina y garantizar que las células sean capaces de fertilizar el ovocito. Sin embargo, las técnicas actuales de preservación han mostrado efectos negativos en la estructura y función de los espermatozoides (Aizpurua *et al.*, 2017).

En la criopreservación el uso de agentes crioprotectores (ACP) es crítico para proteger a la célula del choque osmótico, generado con el descenso de la temperatura, al igual que de la formación de cristales de agua que comprometen la función celular (Sieme *et al.*, 2015).

Los ACP son sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico de la solución dada, es decir, la temperatura más baja en la cual una composición de A y B solidifica o se funde en una mezcla como un elemento puro. Este descenso crioscópico depende únicamente de la concentración del soluto y no de la naturaleza de este (Cisternas, 2009), reflejado como la disminución en la temperatura de fusión. Esto se traduce en la célula como el cambio en la temperatura máxima a la que se producirá la mayor cristalización, ergo mayor deshidratación y cambio en el gradiente osmótico ante la concentración de solutos (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Tabla 1: Agentes crioprotectores más utilizados clasificados por su naturaleza bioquímica. Modificado de Ávila-Portillo *et al.*, 2006

| Alcoholes | Azúcares |
|-----------------|----------|
| Metanol | Glucosa |
| Etanol | Lactosa |
| Propanol | Dextrosa |
| 1-2 propanediol | Sacarosa |
| Glicerol | Fructosa |

Los ACP se pueden clasificar por su naturaleza bioquímica como alcoholes y azúcares (Tabla 1) y también con base en su habilidad para penetrar o no en la célula. Por un lado, los ACP penetrantes se caracterizan por ser de bajo peso molecular como el DMSO y previenen la acumulación excesiva de solutos dentro de la célula durante el proceso de congelamiento,

así como la formación de cristales de hielo que comprometen la integridad de la membrana. Sin embargo, pueden ser tóxicos a altas concentraciones (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Pegg, 2007; Gharajelar *et al.*, 2016).

Los ACP no penetrantes por otro lado son de alto peso molecular y ejercen su acción al promover la rápida deshidratación y disminuir la cantidad de agua fuera de la célula, aumentando la concentración de solutos forzando al agua intracelular a salir. De igual forma, permiten mantener la integridad estructural de la membrana que pierde elasticidad con el descenso de temperatura (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Pegg, 2007; Gharajelar *et al.*, 2016).

A pesar de su clara ventaja, los ACP pueden ser citotóxicos a un nivel osmótico y/o metabólico a diferentes concentraciones (Baxter & Lathe, 1971), y por ello es importante mantener el balance entre los ACP penetrantes y no penetrantes durante el proceso de criopreservación (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Es importante tener presente el tiempo de descenso de temperatura, ya que determina la tasa de formación de cristales de hielo y las concentraciones de solutos fuera y dentro de la célula (Pegg, 2007). Estos dos factores han conducido a diversas técnicas de congelación. Particularmente, en este trabajo, se utilizaron dos de estos métodos: la congelación lenta y la vitrificación.

La congelación lenta es una de las técnicas más empleadas hoy en día para la preservación, no sólo de gametos sino de embriones (Konc *et al.*, 2014). Cuando se comienza a enfriar la célula, en este caso un espermatozoide, el frío alcanza primero la solución exterior. Esto trae como consecuencia la formación de hielo en el medio extracelular y a medida que éste se forma el agua líquida va disminuyendo y la concentración de solutos aumenta. Esto obliga al agua intracelular a salir para compensar la diferencia de las concentraciones de ambos lados de la membrana. La concentración de solutos como la sal dentro del espermatozoide comenzará a subir, la temperatura a la que se formará el hielo

intracelular descenderá y será más difícil que el agua dentro de la célula se congele y dañe sus estructuras. Por ello, con la velocidad de enfriamiento lenta se puede evitar la formación de hielo intracelular, sin embargo, evitar la formación de hielo no es sinónimo de supervivencia. La concentración de sales resulta tóxica al elevarse demasiado y si el volumen de agua disminuye lo suficiente dentro de la célula, puede provocar la deshidratación que dañe irreversiblemente la estructura celular (Pegg, 2007) (Figura 4).

La vitrificación por otra parte es un método novedoso de enfriamiento ultrarrápido que permite que el agua pase al estado vítreo (similar al vidrio) gracias al incremento de la viscosidad del medio evitando la formación de cristales. (Aizpurúa *et al.*, 2017; Tam Le *et al.*, 2019). Este método simplifica y con frecuencia mejora la criopreservación, porque elimina las lesiones mecánicas provocadas por el hielo y la necesidad de encontrar velocidades óptimas de enfriamiento y calentamiento, pero complica los efectos osmóticos de agregar y eliminar agentes crioprotectores e introduce mayor riesgo de toxicidad crioprotectora, ya que este método, necesita que las células se introduzcan en un medio con alta concentración de ACP (Fahy & Wowk, 2014). Si la concentración de solutos es lo suficientemente alta, las soluciones de vitrificación se solidificarán sin ningún riesgo de formación de hielo intracelular o extracelular durante el enfriamiento o calentamiento, independientemente de las velocidades de enfriamiento y calentamiento utilizadas (Figura 4).

Se han echo estudios comparativos de ambos métodos y se ha concluido de forma general, la mejora en espermatozoides vitrificados de humano en relación con la vitalidad, motilidad, morfología, preservación del acrosoma y daño al ADN (Tongdee *et al.*, 2015; Aizpurúa *et al.*, 2017; Riva *et al.*, 2018).

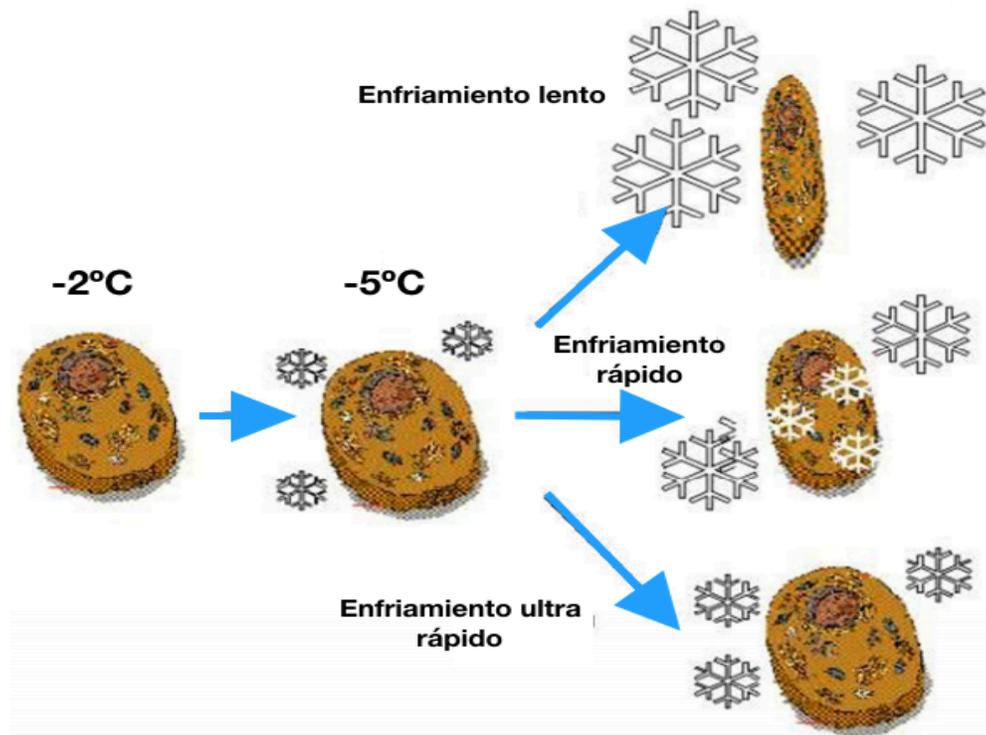


Figura 4. **Esquema de los sucesos físicos que ocurren durante el enfriamiento.** A medida que la temperatura va disminuyendo, el agua fuera de la célula comienza a congelarse formando cristales. La velocidad de este descenso de temperatura afecta la estructura y morfología celular. Si el descenso es lento los cristales extracelulares obligarán al agua intracelular a salir. Esto aumenta la concentración de solutos en su interior y disminuye el punto crioscópico. Si el enfriamiento es rápido el agua intracelular no saldrá con la misma rapidez y se formarán cristales intracelulares. Por último, si el enfriamiento es demasiado rápido no habrá oportunidad que el agua intracelular se congele.

Otros análisis realizados en espermatozoides criopreservados de humano por congelación lenta, han dado como resultado la disminución en la vitalidad y motilidad de las células, daño en el acrosoma (Ozkavukeu *et al.*, 2008), mayor daño al ADN (Riva *et al.*, 2018) y mayor potencial de membrana mitocondrial (Mohamed, 2015). A pesar de la mejoría de la vitrificación sobre la congelación, ambos métodos aportan efectos deletéreos a los espermatozoides cuando se compara con muestras frescas.

El daño criogénico sobre los espermatozoides se ha abordado también desde el punto de vista de las ROS (Amidi *et al.*, 2016). Se sabe que los espermatozoides y óvulos suelen sufrir daños oxidativos durante el proceso de congelación y descongelación cuando los

niveles de ROS superan la capacidad de eliminación de antioxidantes, presentes en el semen o en el medio (Taylor, 2009; Liu *et al.*, 2018; Massignam *et al.*, 2018). La producción excesiva de estas especies reactivas como H_2O_2 y O^{2-} se han sugerido como un factor importante que contribuye al daño criogénico a los espermatozoides (Amidi *et al.*, 2016).

Se ha probado el efecto de diferentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que mitigan el daño oxidativo sobre la viabilidad de espermatozoides de humano criopreservados por distintos medios (Amidi *et al.*, 2016). Por mencionar algunos de estos estudios:

- En 2009, Taylor probó distintas dosis de vitamina E posterior a la congelación y encontró mejora en la motilidad, pero no hubo mejoría en la vitalidad y daño al ADN.
- Rossi y colaboradores (2001) observaron mejora en la motilidad y vitalidad de espermatozoides criopreservados en presencia de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) ambas enzimas con capacidad antioxidante.
- Liu y colaboradores (2018) probaron el antioxidante PRDX2 unido a la proteína viral TAT que le permite ingresar a la célula y reportaron mejora en la motilidad y vitalidad, así como menor fragmentación del ADN y reacción acrosomal espontánea en espermatozoides de hombres con normozoospermia (con valores normales acorde a la OMS) y astenozoospermia (baja motilidad).
- En 2013 Merino y colaboradores probaron el análogo sintético de la vitamina E llamado bitilhidroxitolueno (BHT) en solitario y junto a sucrosa. Concluyeron la mejora en la motilidad progresiva, integridad del ADN y disminución de ROS, pero sin mejora en el potencial de membrana mitocondrial (PMM).
- Fontoura y colaboradores (2016) evaluaron el efecto de incubar los espermatozoides capacitados con leptina antes del proceso de congelamiento. Este grupo encontró

menor daño al ADN, mejor actividad de enzimas antioxidantes como SOD y glutatión peroxidasa (Gpx).

Hasta el momento no existe el antioxidante que mitigue en su totalidad el daño criogénico observado en los espermatozoides después de la congelación. De ahí nuestro interés por evaluar el efecto del nuevo antioxidante llamado EmbryORP® sobre la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides y compararlo entre diferentes protocolos de criopreservación.

1.3. Marco teórico

1.3.1. El espermatozoide

El gameto masculino es la célula altamente especializada que se describe con tres características esenciales: es pequeño, motil y se fusiona con los ovocitos (Lessells *et al.*, 2009). Son células germinales que se producen en los testículos mediante el proceso de espermatogénesis a partir de células germinales (Lombardi, 1998).

En el **Figura 5** se muestra la morfología del espermatozoide. Morfológicamente el espermatozoide se divide en dos regiones: cabeza y flagelo, las cuales se subdividen a su vez en diferentes regiones y estructuras. Esta varía entre las especies y da como resultado alta variedad de tamaños y formas de los espermatozoides (Lombardi, 1998).

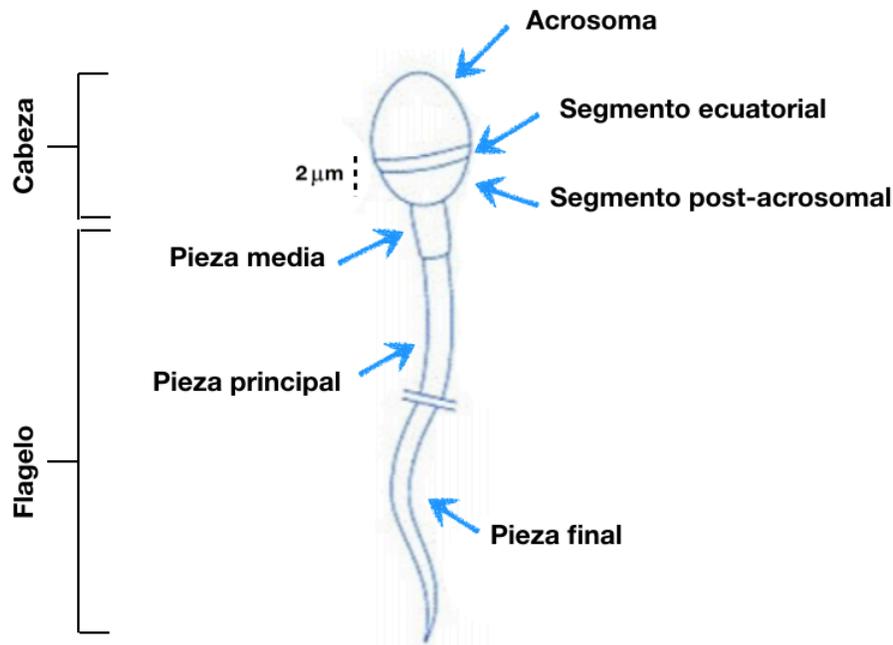


Figura 5. **Representación esquemática de un espermatozoide maduro de humano con sus componentes estructurales.** Modificado de Darszon *et al.*, 2005.

1.3.2. Motilidad, vitalidad, morfología y concentración

La motilidad de los espermatozoides es factor clave que ayuda a determinar su fertilidad, debido a la capacidad de moverse adecuadamente hacia el ovocito es elemento crítico en los embarazos exitosos (Yoshida *et al.*, 2008). Existen dos tipos de motilidad asociados a los espermatozoides, la primera observada al momento de ser eyaculados y la segunda en espermatozoides capacitados a lo largo de su trayecto durante el tracto femenino (Agnihotri *et al.*, 2016), donde su trayectoria deja de ser rectilínea convirtiéndose en oscilante y caracterizada por fuertes impulsos del flagelo (Figura 6) (Silva-Villalobos *et al.*, 2017).



Figura 6. **Motilidad y batido flagelar de espermatozoides no capacitados y capacitados.** De lado izquierdo se muestra el patrón de motilidad del espermatozoide no capacitado, el cual presenta desplazamiento lineal y bajo batido flagelar. Una vez capacitado adquiere la motilidad hiperactiva caracterizada por el batido flagelar más amplio y desplazamiento abrupto. Modificado de Darszon *et al.*, 2011).

Clínicamente la motilidad de los espermatozoides se puede catalogar de manera sencilla acorde a la OMS: 1) Motilidad progresiva (MPR) donde las células se mueven activamente, ya sea de forma lineal o en círculo grande independientemente de la velocidad. 2) Motilidad no progresiva (MNP) cuando no hay desplazamiento, pero se puede observar el movimiento de la cabeza o el batido flagelar. 3) Inmotilidad cuando no hay movimiento de ningún tipo. Se considera que el donador tiene buena motilidad cuando el total de espermatozoides MPR + MNP es mayor al 40% de la muestra total o el valor de MPR es mayor o igual al 32% (WHO, 2010).

Otro parámetro importante es la vitalidad, la cual refleja la proporción de espermatozoides vivos en la muestra dada. Esto puede estar determinado por la integridad celular (Moskovtsev & Librach, 2013) y evaluada a través de diversas técnicas como la prueba de hinchazón hipoosmótica o tinción con colorantes impermeables (Cooper & Hellenkemper, 2009). Es clínicamente importante saber si los espermatozoides inmóvil están vivos o muertos debida al porcentaje de células viables normalmente excede al de las células móviles. Una muestra de semen debe tener 58% o más de espermatozoides vivos para considerarse sana (WHO, 2010).

La elevada variabilidad de los espermatozoides humanos hace difícil determinar la morfología óptima que estos deben tener, en relación a la forma de la cabeza, la pieza media

y el flagelo. Sin embargo, observaciones de espermatozoides en puntos claves durante su trayecto por el tracto femenino, pasando por el moco endocervical hasta la zona pelucida del ovocito, permiten definir la apariencia fertilizante que las células deberían tener (WHO, 2010) (Figura 7). Esto puede ser controversial, ya que Kovac y colaboradores demostraron que hombres con completa falta de espermatozoides morfológicamente óptimos según los parámetros que marca la OMS, tuvieron altas tasas de embarazo normales (Kovac *et al.*, 2017). Lo anterior demuestra que la morfología no determina la capacidad fecundante de los espermatozoides, pero si es indicador del estado de salud del individuo, lo cual está directamente relacionado con la fisiología del cuerpo y al estrés ambiental al que está sujeto (Menkveld *et al.*, 2011).

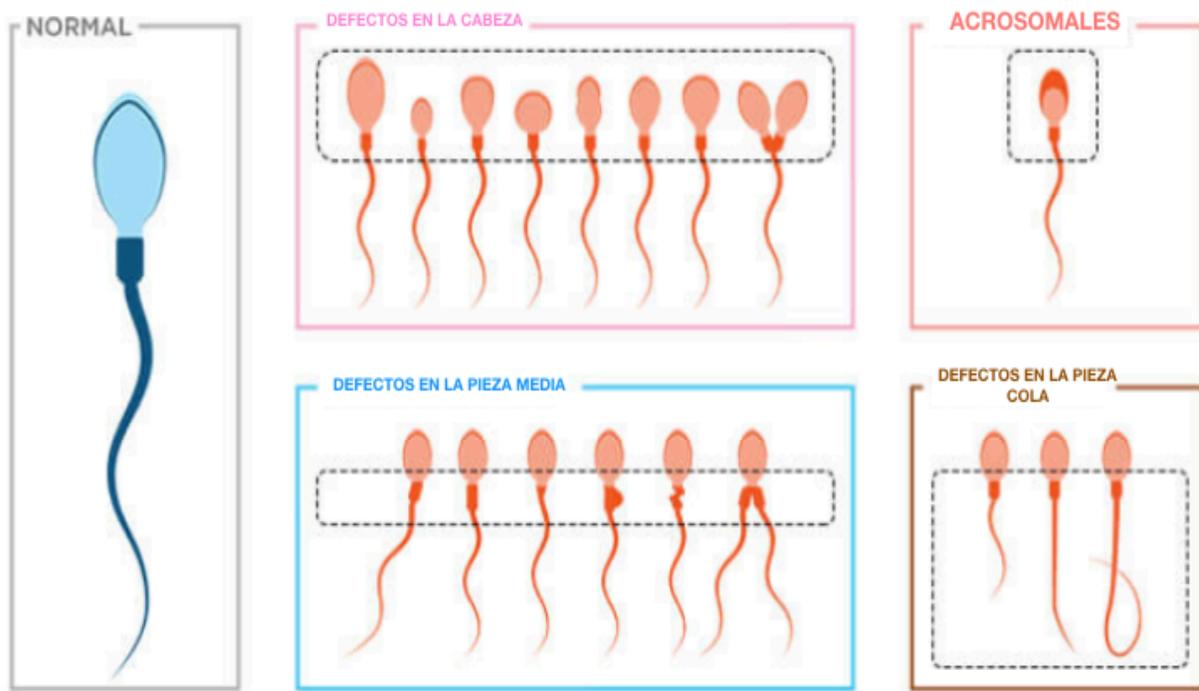


Figura 7. **Morfología del espermatozoide.** Distintas morfologías que puede tener un espermatozoide en relación con su cabeza, pieza media, cola y acrosoma.

Tanto la concentración espermática como el número total de espermatozoides son parámetros que están relacionados con la fertilidad y éxito para lograr el embarazo. Según la OMS, hombres con cuenta espermática menor de 15×10^6 células por mililitro, se consideran oligozospermicos (WHO, 2010).

La motilidad, vitalidad, morfología y concentración espermática se ven afectadas por parámetros fisiológicos como el pH, el PMM, potencial de óxido reducción.

1.3.3. El papel del pH en el espermatozoide

El pH del medio desempeña un papel importante en la fisiología del espermatozoide (WHO, 2010). Está involucrado en la estructura y regulación de proteínas como la actividad enzimática, transportadores, canales iónicos como CatSper (canal de Ca^{2+}), Slo3 (canal de K^+), el intercambiador Na^+/H^+ (Nishigaki *et al.*, 2014) y eventos de transcripción (Burgstaller *et al.*, 2019).

Xhou y colaboradores (2015) determinaron que el pH en el rango de 7.2 a 8.2 es agente crítico de procesos como la motilidad total, la MPR, y la capacidad de penetración del espermatozoide en el óvulo; al igual que en su vitalidad y capacitación que eventualmente da pie a la RA.

1.3.4. Capacitación

Una serie de eventos bioquímicos y fisiológicos conocidos en su conjunto como capacitación (Treviño *et al.*, 2001; Carballo *et al.*, 2011; Ickowicz *et al.*, 2012), preparan al espermatozoide para que pueda llevar a cabo la reacción acrosomal (RA). La capacitación incluye cambios morfo fisiológicos, como son la fosforilación de proteínas, cambios en la permeabilidad de la membrana, activación de canales iónicos y flujo de protones (Darszon *et al.*, 2001; Cánovas & Coy, 2008;), así como el cambio característico de la hiperactivación en los patrones de motilidad (Del Río *et al.*, 2007).

En humanos la capacitación ocurre dentro del tracto genital femenino y se modula por factores que se encuentran en el mismo (como albúmina y colesterol), así como por componentes de las capas externas del óvulo (Darszon *et al.*, 1999). Posterior a la eyaculación, cuando los espermatozoides llegan al istmo, caracterizado por cilios luminales epiteliales y plegamientos de la mucosa, se retienen en esta sección y es donde pierden factores descapacitantes que permiten la salida de colesterol de la membrana (Olivera *et al.*, 2006), acompañado del ingreso de Ca^{2+} , entre otros cambios (De Blas *et al.*, 2009).

1.3.5. El acrosoma y la reacción acrosomal

La RA es el proceso de fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa del acrosoma, habilitando así, la liberación de enzimas almacenadas en esta vesícula exocítica (Figura 8). La RA le permite el paso a través de las células del cumulus, la zona pelúcida y finalmente la penetración del óvulo (Olivera *et al.*, 2006; Del Río *et al.*, 2007).

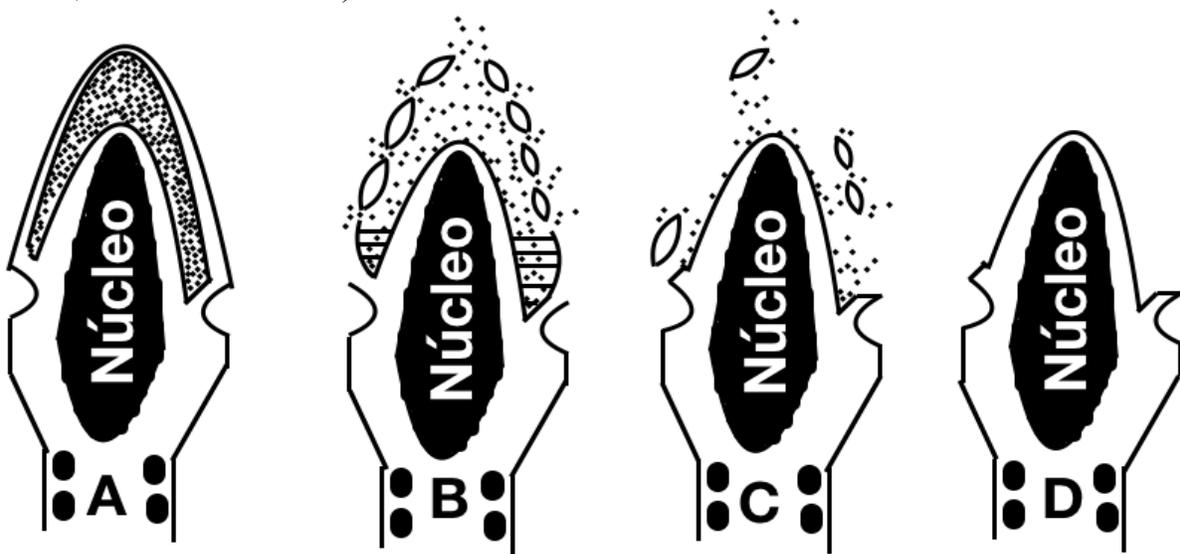


Figura 8. **Reacción del acrosoma humano.** A) Espermatozoide con el acrosoma intacto. B) Reacción del segmento principal: fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática. C) Reacción acrosomal en el segmento ecuatorial. D) Espermatozoide con reacción acrosomal. Modificado de Del Río *et al.*, 2007.

1.3.6. *La mitocondria y el potencial de membrana mitocondrial*

Se ha demostrado que la mitocondria juega un papel crucial en la fisiología del espermatozoide. Además de la motilidad, la actividad de la acrosina (enzima hidrolítica dentro del acrosoma que le permite a la célula abrirse paso a través de la zona pelúcida), la integridad de la cromatina y la capacidad del espermatozoide para llevar a cabo la RA, pueden ver afectadas por la función mitocondrial (Zhang *et al.*, 2019).

La mitocondria es el organelo celular que tiene tamaño variable entre 0.1 μm y 0.5 μm de diámetro en el humano. Posee el sistema de doble membrana, una externa y otra interna que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (Alberts *et al.*, 2002) (Figura 9).

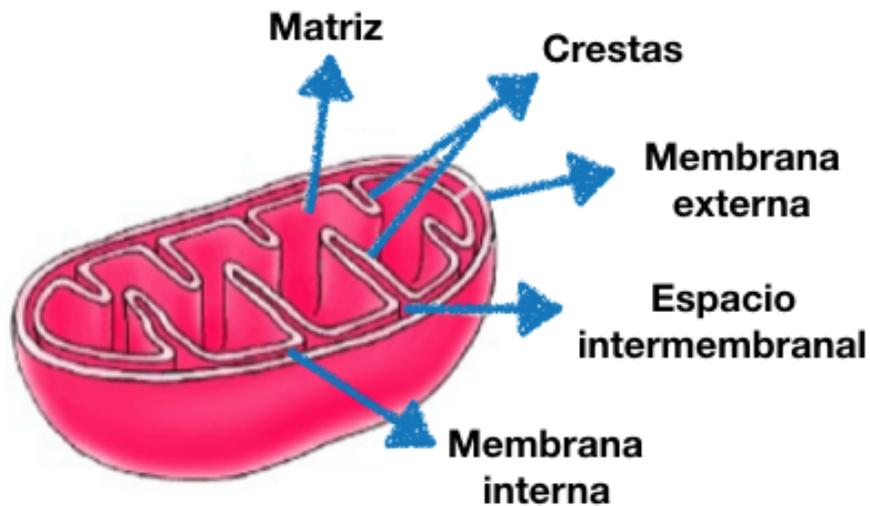


Figura 9. **Estructura de la mitocondria.** Esquema de una mitocondria donde se señalan la membrana externa, el espacio intermembranal, la membrana interna, la matriz y las crestas. Modificado de Cooper & Hausman, 2013.

El PMM es el gradiente electroquímico de protones que se forma gracias al bombeo de estos desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal durante la cadena transportadora de electrones a través de los complejos I, III y IV (Zorova *et al.*, 2018). Así la membrana mitocondrial interna separa dos compartimientos con diferente concentración de

protones, lo que produce diferencias en la concentración química de los mismos y en la distribución de la carga. Este gradiente de protones permite a la ATP sintasa utilizar el flujo de protones para producir ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato orgánico, por tanto, mientras mayor sea el PMM mayor será la capacidad de energía de la membrana interna y potencialmente mayor será la síntesis de ATP (Sánchez & Arboleda, 2008).

Los niveles de PMM y ATP se mantienen a nivel constante, aunque pueden fluctuar acorde a las necesidades fisiológicas de la célula. Sin embargo, cambios sostenidos en ambos factores, pueden ser perjudiciales y provocar la muerte celular y diferentes patologías relacionadas las ROS cuyo balance es crítico para la homeostasis celular (Zorova *et al.*, 2018).

1.3.7. Potencial de óxido reducción

Las ROS son moléculas altamente reactivas que se mantienen en equilibrio gracias a la capacidad antioxidante de la célula. El potencial de óxido reducción (ORP) es una medida directa del desbalance de estas especies que puede llevar al estrés oxidativo, que a su vez producirá efectos deletéreos. (Agarwal *et al.*, 2016). Se ha observado en el espermatozoide que la proporción de estas moléculas están relacionadas con la compactación de la cromatina, la capacitación, la hiperactividad, la reacción acrosomal y la capacidad de fusión con los ovocitos (Agarwal *et al.*, 2016). Sin embargo, el exceso de ROS da como resultado la peroxidación lipídica, el daño al ADN y la inducción de la apoptosis.

Clínicamente el estrés oxidativo generado por las ROS se traduce como bajas tasas de fecundación, fracaso de implantación, en el desarrollo embrionario, abortos y bajo éxito de las TRA (Agarwal & Danh Bui, 2017).

La motilidad, vitalidad, morfología, concentración, pH, PMM, potencial óxido reducción y la capacidad del espermatozoide para llevar a cabo la RA son parámetros que

ayudan a determinar la viabilidad de la célula y su capacidad fecundante. Durante los eventos de criopreservación, como congelación lenta y/o vitrificación se ven severamente afectados. Debido a este es imperativo encontrar nuevas metodologías criogénicas que permitan mitigar el daño observado a los espermatozoides.

Capítulo II

Justificación

La implementación de técnicas novedosas para la criopreservación de gametos, concretamente espermatozoides, es un área con alto potencial biomédico que permite combatir la creciente infertilidad en el humano (Restrepo-Betancur *et al.*, 2009; Berrios *et al.*, 2010; Restrepo-Betancur *et al.*, 2012; Casillas *et al.*, 2018). Sin embargo, las técnicas actuales de congelamiento tienen un elevado porcentaje de células dañadas que no son siempre aptas para la reproducción asistida (Berrios & Sánchez, 2011; Berrios *et al.*, 2010; Ugarelli *et al.*, 2017). Esto hace crucial la búsqueda de nuevas metodologías para asegurar la capacidad fecundante de los espermatozoides criogénicos.

El presente trabajo de investigación compara parámetros de fertilidad en espermatozoides humanos sometidos a congelación lenta, vitrificación mediada por el kit Esay-Sperm[®] (iGLS, Alicante, España) y en conjunto con el medio antioxidante EmbryORP[®], ambos facilitados por el Centro de Innovación Tecnológica y Medicina Reproductiva (Citmer), México. Esto, con la finalidad de sentar bases para futuras investigaciones que validen la vitrificación como el método idóneo para la criopreservación de espermatozoides de humano y la pertinencia de la presencia del antioxidante en el medio de vitrificación.

Capítulo III

Hipótesis

El método de vitrificación con antioxidante EmbryoORP® tendrá como resultado, mayor número de espermatozoides con parámetros de fertilidad óptimos comparado a la vitrificación sin antioxidante; ésta a su vez, tendrá mayor número de espermatozoides óptimos en comparación con la congelación lenta.

Capítulo IV

Objetivos

4.1. Objetivo general

Comparar parámetros de fecundidad entre espermatozoides preservados mediante vitrificación suplementado con el medio antioxidante EmbryORP® con aquellos sometidos a vitrificación sin suplemento y congelación lenta.

4.2. Objetivos particulares

- ◇ Comparar ocho parámetros de fecundidad entre espermatozoides vitrificados en presencia y ausencia de antioxidante EmbryORP® y congelados lentamente:
 - 1) motilidad
 - 2) vitalidad
 - 3) morfología
 - 4) concentración
 - 5) pH
 - 6) Reacción acrosomal
 - 7) Potencial de membrana mitocondrial
 - 8) Potencial de óxido reducción

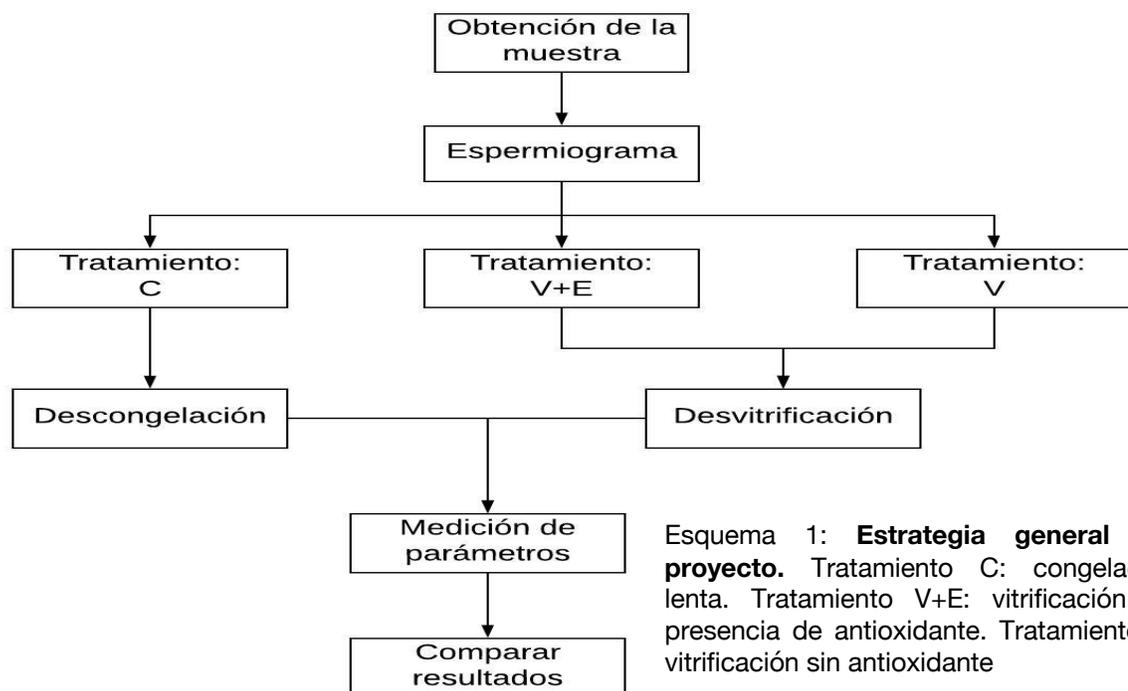
Capítulo V

Materiales y métodos

5.1. Estrategia general

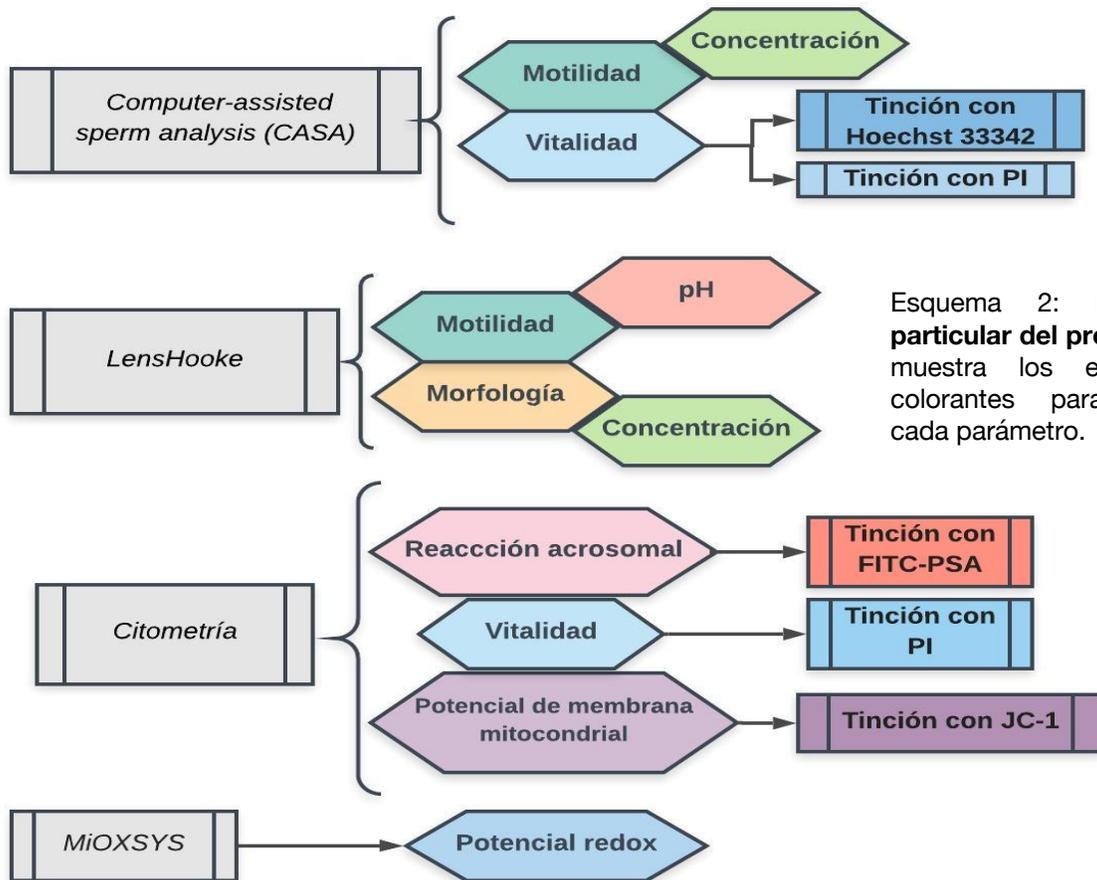
Una vez que se obtuvo la muestra del donador se realizó un espermograma sencillo donde se evaluó el pH y la motilidad de las células antes del procedimiento de criopreservación. Posteriormente, se contó el número de células y se dividió en tres partes de igual volumen para aplicar los diferentes tratamientos de criopreservación.

Las muestras ya procesadas se mantuvieron en nitrógeno líquido un aproximado de 3 meses antes de la reanimación. Pasado este tiempo, se midieron los parámetros propuestos y se compararon los resultados obtenidos (**Esquema 1**).



5.2. Estrategia particular

Cada tratamiento se dividió a su vez en dos viales rotulados como “A” y “B” para reanimar las células en distinto momento y realizar las mediciones pertinentes. Las células en los crioviales “A” se reanimaron para evaluar su motilidad, concentración y vitalidad tiñendo con yoduro de propidio (PI) más Hoechst 33342 y concentración mediante el sistema CASA. La motilidad, morfología, concentración y pH se evaluó con el dispositivo LensHooke®. Finalmente el ORP se evaluó con el equipo MiOXSYS®. Tanto el LensHooke® como el MiOXSYS fueron proporcionados por Citmer, México. Por otro lado, el vial “B”, se utilizó para las mediciones de vitalidad, RA y PMM, utilizando citometría de flujo, tiñendo las células con PI, FITC PSA y JC-1 respectivamente. (**Esquema 2**). Ver Apéndice 2 para el fundamento de cada colorante.



Esquema 2: **Estrategia particular del proyecto.** Se muestra los equipos y colorantes para evaluar cada parámetro.

5.2.1. Muestras biológicas

Con base en los requerimientos establecidos por la OMS y bajo la autorización previa del Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, 20 individuos humanos sanos de 22 a 40 años donaron muestra de semen, obtenida mediante eyaculación y depositado en un contenedor estéril después de 48 horas como mínimo de abstinencia sexual.

5.2.2. Vitricación y desvitricación

Obtenida la muestra se dejó incubar 30 - 45 minutos a 37°C y en la atmósfera de 5% de CO₂ para que licuara. Pasado este tiempo, si aún no licuaba se trabajó mecánicamente hasta lograr la consistencia líquida deseada. Se rotularon los crioviales en donde se almacenó la muestra indicando el tratamiento: Vitricado (V), Vitricado suplementado con antioxidante (V+ E) y Congelado (C), código del donante, el nombre de quien procesó la muestra y la fecha de congelación.

Para el caso de la muestra V+E, se calculó el volumen de antioxidante EmbryoORP[®] necesaria acorde al volumen de semen, siguiendo la proporción de 10 µl de antioxidante por 2 ml de muestra de semen. Tanto para la muestra V como para la V+E, se añadió el medio de vitricación del kit Easy-Sperm[®] (iGLS, Alicante, España), rotulado por el fabricante como V1 y se dejó atemperar entre 5 - 10 minutos. La cantidad de V1 utilizada fue en proporción 1:1 con el volumen de la muestra. Se adicionó una gota de medio V1 cada 5 segundos agitando el tubo con la muestra de forma simultánea. Una vez adicionado todo el medio se homogenizó con ayuda de una pipeta y se dejó reposar 5 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo se cargó la muestra en una jeringa de 1 a 3 mililitros sin hacer burbujas, y se añadió gota a gota en un vaso con nitrógeno líquido agitando suavemente para

formar perlas que no chocaran entre sí hasta terminar todo el volumen de la muestra. Se recolectaron las perlas generadas con ayuda de pinzas y un embudo, se cerró el vial y se almacenó en nitrógeno líquido.

Para la desvitrificación, como primer paso, se atemperaron 2 ml de medio del kit Easy-Sperm[®] (iGLS, Alicante, España) en un tubo cónico de 5 ml rotulado como V2, a 41°C con baño maría durante 15 a 20 minutos junto con 10 µl de antioxidante EmbryoORP[®] para el tratamiento V+E. Transcurrido el tiempo se colocó la muestra en un recipiente con nitrógeno líquido, y con ayuda de pinzas y sumo cuidado de mantenerla cerca de los vapores, se vertió el contenido en el tubo con medio V2; sin sacar éste del baño maría y agitar vigorosamente hasta deshacer las perlas sin exceder más de unos segundos. Hecho esto, se incubó la muestra a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, la muestra se sacó y se centrifugó a 300 g por 5 minutos para separar las células. Se retiró el sobrenadante y se homogenizó con ayuda de una pipeta en el volumen de 1 ml de HTF (Tabla 6) suplementado con EmbryoORP[®] para el tratamiento V+E siguiendo la proporción de 100 µl de antioxidante por 10 ml de HTF, y HTF sin antioxidante para los tratamientos restantes.

5.2.3. Congelación lenta y descongelación

Una vez obtenida la muestra se dejó incubar 30 - 45 minutos a 37°C y con la atmósfera de 5% de CO₂ para que licuara. Pasado este tiempo, si aún no licuaba se trabajó mecánicamente hasta lograr la consistencia líquida deseada. Se rotularon los crioviales como se especificó en el punto 5.2.2. Después se añadió medio de congelamiento (TEST yOLK Buffer-Irvine Scientific) en proporción 1:1 con el volumen de la muestra. Se adicionó una gota cada 5 segundos agitando el tubo de la muestra de forma simultánea. Una vez adicionado todo el medio se homogenizó con ayuda de una pipeta y se dividió la muestra en los crioviales. Se

dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego 10 minutos entre 2 - 8 °C en la parte baja del refrigerador. Posteriormente la muestra se colocó en el congelador de -18 a -23°C por 10 minutos. Por último, los viales se montaron en una escalerilla que se introdujo de forma vertical en un recipiente con nitrógeno líquido para exponerlos a los vapores por un periodo de 10 minutos. Finalmente, se introdujeron directamente al nitrógeno líquido terminando su escala de descenso de temperatura.

Para descongelar primero se retiró la muestra del nitrógeno líquido y se dejó descongelar a temperatura ambiente durante 5 - 10 minutos. Transcurrido el tiempo se colocó en baño maría durante 5 - 10 minutos más. Después se sacó la muestra y centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos más. Se retiró el sobrenadante y homogenizó con ayuda de una pipeta en el volumen de 1 ml de HTF

5.2.4. Equipos

5.2.4.1. LensHooke®

LensHooke® Semen Quality Analyzer es un dispositivo capaz de evaluar cuatro parámetros de importancia clínica en los espermatozoides: pH, concentración, morfología, y motilidad, clasificando esta última en motilidad progresiva, no progresiva y total acorde a la OMS. Para ello hace uso de cassetts desechables donde se colocaron 40 µl de muestra reanimada de células resuspendidas en medio HTF con y sin antioxidante, para cada uno de los tratamientos.

5.2.4.2. Análisis de semen asistido por computadora (Computer semen analysis: CASA)

Para las mediciones de motilidad y vitalidad se utilizó el sistema CASA operado por el software de adquisición “Sperm Class Analyzer”[®] (Microptic Automatic Diagnostic Systems), acoplado a un microscopio Nikon Labophot Fluorescente de epifluorescencia con contraste de fase y a un aumento de 10X.

El sistema permite la evaluación precisa, repetitiva y automática de distintos parámetros del espermatozoide como: motilidad, concentración, morfología, fragmentación del ADN, vitalidad, reacción acrosomal y leucocitos; siguiendo los criterios de OMS u otros definidos por el usuario.

Para la evaluación de la motilidad se colocaron 10 μ l de muestra en una cámara *sperm track* y se ajustó el programa acorde al volumen de la muestra, pH y tamaño de los espermatozoides. Por otro lado, para la vitalidad se añadieron 10 μ l de muestra teñida con Hoechst 33342 (25 ng/ml), PI (10 μ M) en un portaobjetos y se observó al microscopio.

5.2.4.3 MiOXSYS[®]

El sistema MiOXSYS hace la prueba de análisis de semen de diagnóstico rápido que utiliza la tecnología electroquímica para la medición cualitativa (milivoltios) del potencial de oxidación-reducción estática (sORP) en el semen humano. Está diseñado para medir la transferencia de electrones de reductores a oxidantes y calcular el ORP. Para ello utiliza sensores desechables en donde se les colocó 10 μ l de muestra.

5.2.4.4. Citometría de flujo

La citometría de flujo permite el análisis multivariable de poblaciones celulares heterogéneas mediante la clasificación por tamaño (dispersión frontal (FSC)), complejidad (dispersión

lateral (SSC)) y la intensidad de fluorescencia. Además, permite discriminar partículas, restos celulares u otros contaminantes para las evaluaciones de fluorescencia.

Para las mediciones de reacción acrosomal y potencial de membrana mitocondrial se utilizó el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Becton Dickinson, #Cat: 338960). El análisis se realizó con el software FlowJo (Tree Star, 9.3.3). Para cada para cada parámetro evaluado con citometría se utilizaron los fluorocromos mostrados en la **Tabla 2** junto a su concentración final. Esta se determinó por curvas de titulación previas a este trabajo. (Ver Apéndice 1.).

Tabla 2: Descripción fluorocromos utilizados para las mediciones de RA y PMM

| Colorante | Filtro | Ex (nm) | Em (nm) | Concentración final utilizada |
|-----------|--------|---------|---------|-------------------------------|
| FITC-PSA | FITC | 488 | 516 | 1 µg/ml |
| PI | PI | 536 | 620 | 50 nM |
| JC-1 | FITC | 490 | 516 | 3 µM |

Al existir la superposición en los espectros de emisión de los fluorocormos utilizados es necesario realizar una compensación de la fluorescencia mediante el *software* FACSDiva. Para compensar se requiere adquirir 5 000 eventos de células sin teñir, de células positivas para la fluorescencia verde teñidas con FITC-PSA y de células positivas para la fluorescencia en rojo teñidas con PI.

Se realizaron curvas de calibración para cada uno de los colorantes utilizados para encontrar la dosis mínima para las mediciones. Ver Apéndice 1.

El análisis estadístico de los resultados se realizó en el *software Prism 6*. Como primer análisis se realizó una prueba de normalidad D'Agostino-Pearson a los datos para determinar si tenían comportamiento ajustado a la distribución normal. En la **Tabla 3** se muestra la prueba estadística utilizada para cada parámetro evaluado.

Tabla 3: Prueba estadística utilizada para cada uno de los parámetros evaluados con una significancia de $p < 0.05$

| Parámetro | Prueba estadística |
|----------------------------|--|
| Motilidad (CASA) | <i>Kuskal-Wallis</i> |
| Motilidad (LensHooke®) | <i>T-student</i> |
| pH | |
| Morfología | |
| Vitalidad (CASA) | |
| Vitalidad (citometría) | ANOVA de una vía y <i>Tukey</i> como prueba post hoc |
| Concentración (CASA) | |
| RA | |
| PMM | |
| Concentración (LensHooke®) | |
| Potencial óxido reducción | <i>Mann Whitney</i> |

Capítulo VI

Resultados

6.1. Motilidad

6.1.1. *CASA*

Descongelada la muestra se contó el número de células en una cámara Makler y se ajustó la concentración a 10×10^6 células por mililitro para cada uno de los tratamientos, cuando fuese necesario. El sistema CASA cuenta con un software de análisis “Sperm Class Analyzer™” que sigue la trayectoria de la cabeza mediante la adquisición de videos cortos y los resultados se depuraron eliminando restos celulares.

El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y no progresiva para los tres tratamientos se muestra en las **Figura 10 y 11**. Contrario a lo esperado, el tratamiento C resultó en mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y no progresiva en comparación al tratamiento V+E. Por otra parte el tratamiento V dio un mayor número de células con motilidad progresiva que el tratamiento con V+E, pero valores similares en referencia a la motilidad no progresiva. En la **Figura 12** se muestra la suma de los valores de motilidad.

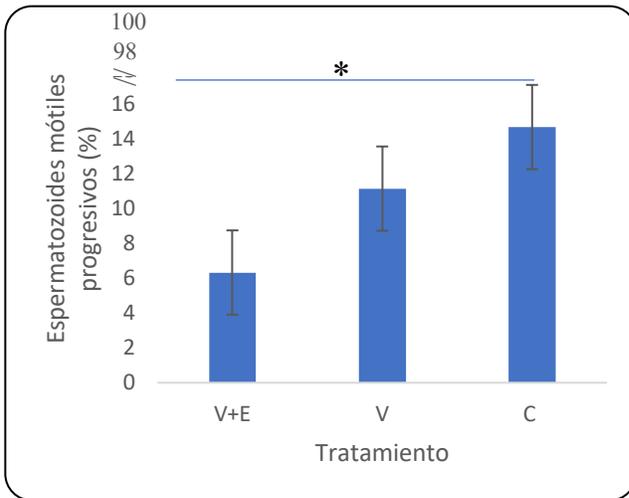


Figura 10. **La presencia de EmbryoORP® no mejora la motilidad progresiva en comparación a la vitrificación sin antioxidante y la congelación lenta.** La motilidad progresiva de espermatozoides descongelados después del proceso de vitrificación en ausencia de antioxidante y congelación lenta fue mayor que el tratamiento con antioxidante. Se midió el porcentaje de motilidad progresiva mediante el equipo CASA. (n = 17). La prueba de *Kruskal-Wallis* mostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos V+E y C ($p = 0.0404$).

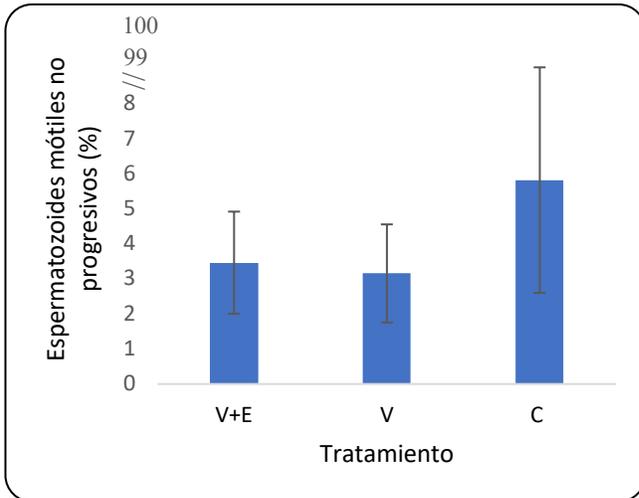


Figura 11. **La presencia de EmbryoORP® no mejora la motilidad no progresiva en comparación a la congelación lenta.** La motilidad no progresiva de espermatozoides vitrificados en presencia y ausencia de antioxidante fue menor a la cantidad obtenida por la congelación lenta. El análisis se hizo mediante el equipo CASA (n = 17). La prueba de *Kruskal-Wallis* mostró que no existe diferencia significativa entre los tres tratamientos y en la motilidad ($p = 0.0991$).

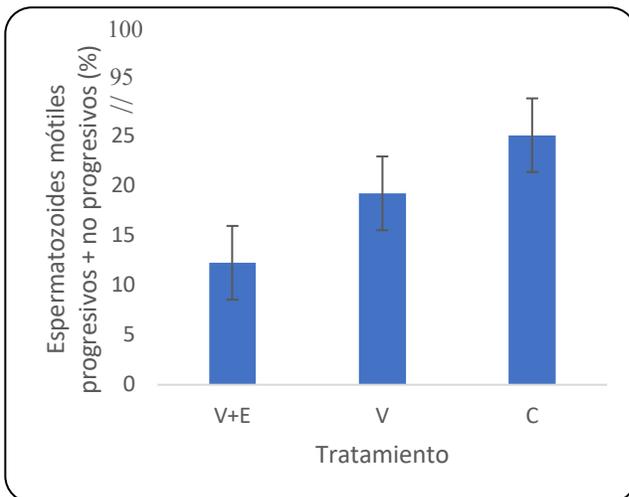


Figura 12. **La presencia de EmbryoORP® no mejora la motilidad total de los espermatozoides en comparación a la congelación lenta.** La motilidad total de espermatozoides vitrificados en presencia y ausencia de antioxidante fue menor a la cantidad obtenida por la congelación lenta. El análisis se hizo mediante el equipo CASA (n = 17). La prueba de *Kruskal-Wallis* mostró que no existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos y en la motilidad ($p = 0.1417$).

6.1.2 *LensHooke*[®]

Se midió de igual forma la motilidad progresiva y no progresiva de los espermatozoides descongelados con en el dispositivo *LensHooke*[®]. La intención fue comparar los datos con el equipo CASA convencional y este equipo comercial de fácil utilización para validar su funcionamiento.

La medición se realiza añadiendo 40 μ l de muestra en un casete especial para el equipo que son de alto costo, por lo que en este caso sólo se comparó la muestra V con V+E. Se hizo lo mismo para los parámetros de pH y morfología.

Encontramos de forma similar que con el sistema CASA, no existe diferencia significativa entre los tratamientos de motilidad progresiva (**Figura 13**) y no progresiva (**Figura 14**) entre los tratamientos en presencia y ausencia del antioxidante EmbryoORP[®]. En la **Figura 15** se muestra la suma de los valores de motilidad.

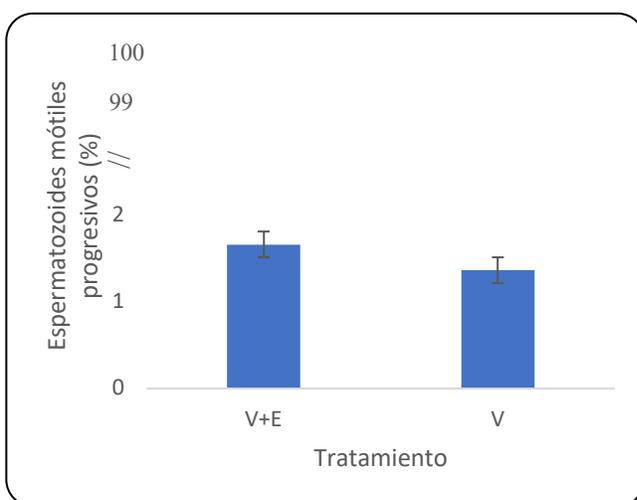


Figura 13. La presencia de EmbryoORP[®] no mejora la motilidad progresiva de espermatozoides vitrificados. La motilidad progresiva de espermatozoides vitrificados en presencia y ausencia de antioxidante fue la misma. El análisis se hizo mediante el equipo *LensHooke*[®]. (n = 19). La prueba *T-student* reveló que no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos y la motilidad. ($p = 0.8675$)

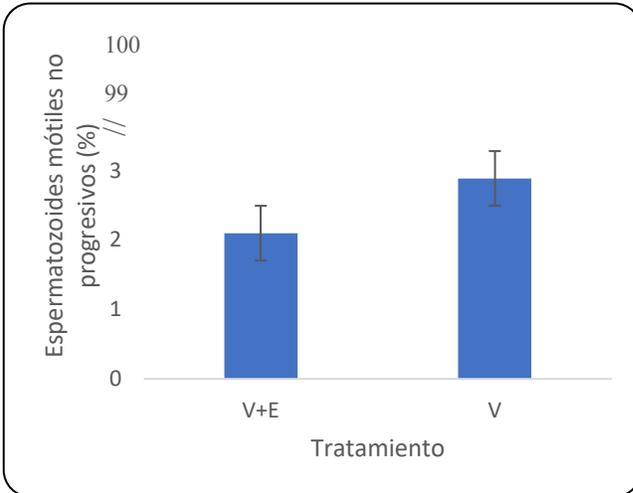


Figura 14. **La presencia de EmbryoORP® no mejora la motilidad no progresiva de espermatozoides vitrificados.** La motilidad no progresiva de espermatozoides vitrificados en presencia y ausencia de antioxidante fue similar. El análisis se hizo mediante el equipo Lenshooke® (n = 19). La prueba *T-student* reveló que no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos y la motilidad. (p = 0.7424)

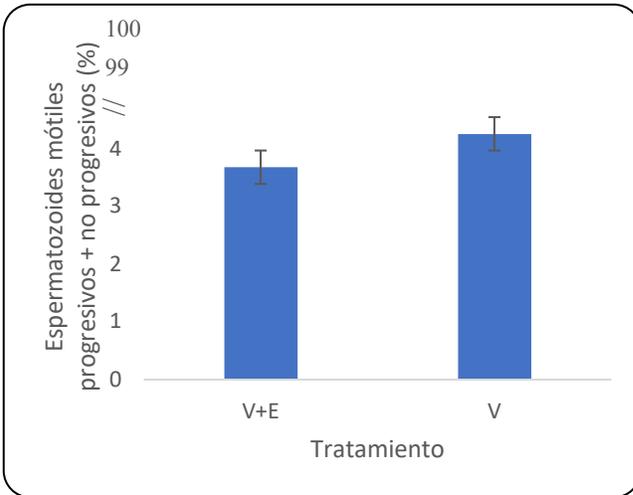


Figura 15. **La presencia de EmbryoORP® no mejora la motilidad no progresiva de espermatozoides vitrificados.** La motilidad total de espermatozoides vitrificados en presencia y ausencia de antioxidante no fue estadísticamente diferente. El análisis se hizo mediante el equipo Lenshooke® (n = 19). La prueba *Mann-Whitney* reveló que no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos y la motilidad. (p = 0.7274)

6.2. Vitalidad

6.2.1. CASA

Se analizó también la vitalidad con el sistema CASA tiñendo con Hoechst 33342 (25 ng/ml) y de PI (10 μM) para discernir entre las células vivas y muertas. Una vez filtrado los datos se encontró que existe diferencia significativa de la vitrificación con y sin antioxidante con la congelación lenta (**Figura 16**).

Contrario a lo esperado, la mayor supervivencia se dio en la muestra conservada por congelación lenta, mientras que el porcentaje de células vivas en los tratamientos V+E y V fue igual.

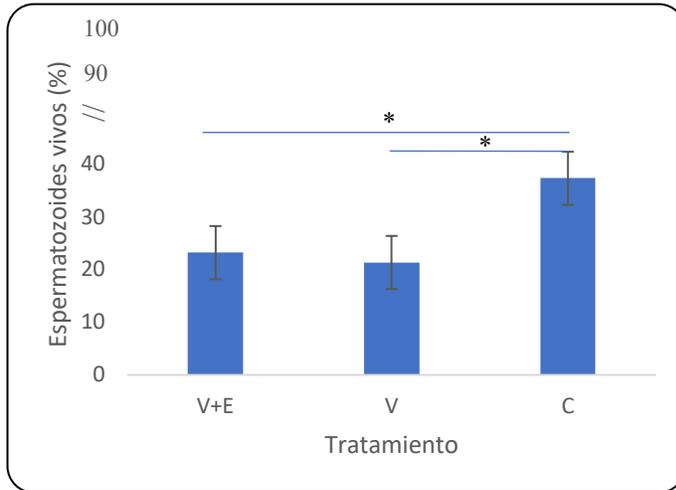


Figura 16. **La congelación lenta tiene como resultado espermatozoides con un mayor porcentaje de vitalidad que la vitrificación en presencia o ausencia de EmbryoORP®.** El promedio de células vivas después de la congelación fue mayor comparado con la supervivencia observada en la vitrificación, sin importar la presencia de EmbryoORP®. El análisis se hizo mediante el sistema CASA (n = 19). La ANOVA de una vía reveló que existe una diferencia significativa entre la congelación con los otros dos tratamientos (p = 0.0038).

6.2.2. Citometría

La vitalidad de los espermatozoides también se evaluó por citometría de flujo tiñendo con PI (50 nM). La **Figura 17** muestra que la vitalidad fue mayor en los espermatozoides congelados lentamente, resultado que coincide con lo obtenido mediante CASA. Existe diferencia significativa entre V+E con V como con C.

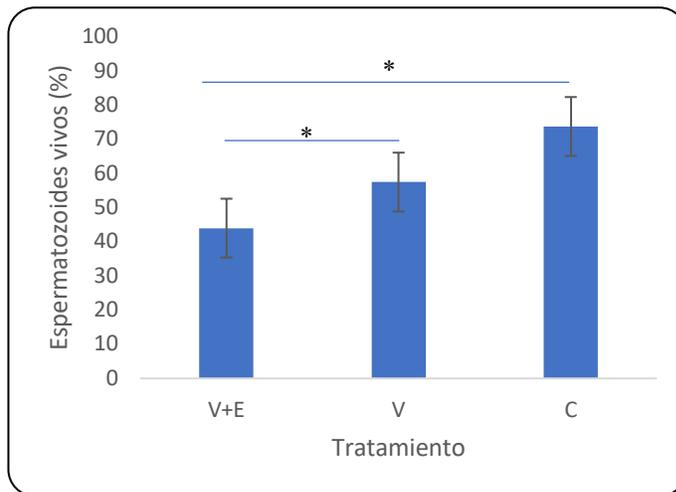


Figura 17. **La congelación lenta y la vitrificación sin antioxidante tienen como resultado espermatozoides con un mayor porcentaje de vitalidad que la vitrificación en presencia de EmbryoORP®.** El promedio de células vivas después de la congelación y vitrificación sin suplemento fue mayor a la supervivencia observada en la vitrificación con antioxidante. El análisis se hizo mediante citometría de flujo (n = 16). La ANOVA de una vía reporta que existe una diferencia significativa entre el tratamiento V+E con V y C (p = 0.0052)

6.3. Concentración

6.3.1. *CASA*

La concentración se evaluó por el sistema CASA para los tres tratamientos antes y después de la criopreservación. Se encontró que existe clara diferencia en la concentración antes y después del procedimiento, perdiéndose una gran cantidad de células. (**Figura 18**).

Se evaluaron por separado los tratamientos para discriminar de mejor manera si existe o no diferencia en la concentración de espermatozoides. A pesar de no haber diferencias significativas, la congelación lenta dio como resultado menor número de células recuperadas mientras que la vitrificación tuvo un mayor porcentaje (**Figura 19**).

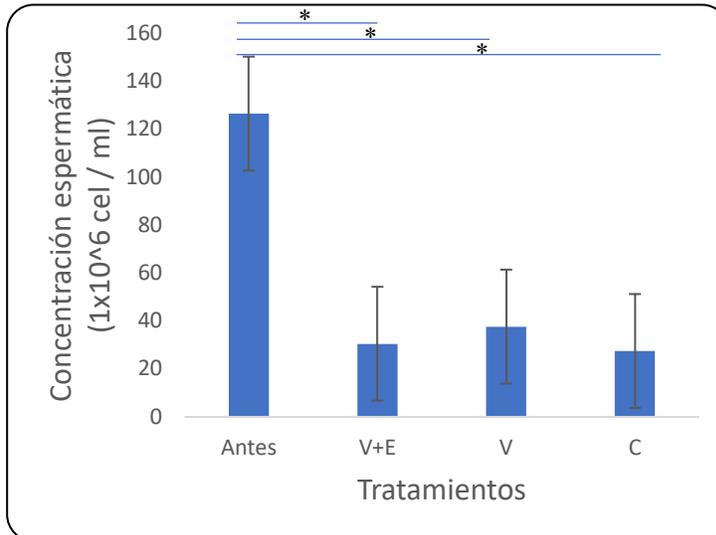


Figura 18. La concentración de espermatozoides se ve disminuida después del proceso de congelación. Existe una clara diferencia en la concentración espermática antes y después del proceso de criopreservación sin importar la presencia o ausencia de EmbryORP® o si se congelan lentamente los espermatozoides. El análisis se hizo mediante el sistema CASA (n =19). La ANOVA de una vía reportó una diferencia significativa antes y después de la congelación (p < 0.0001).

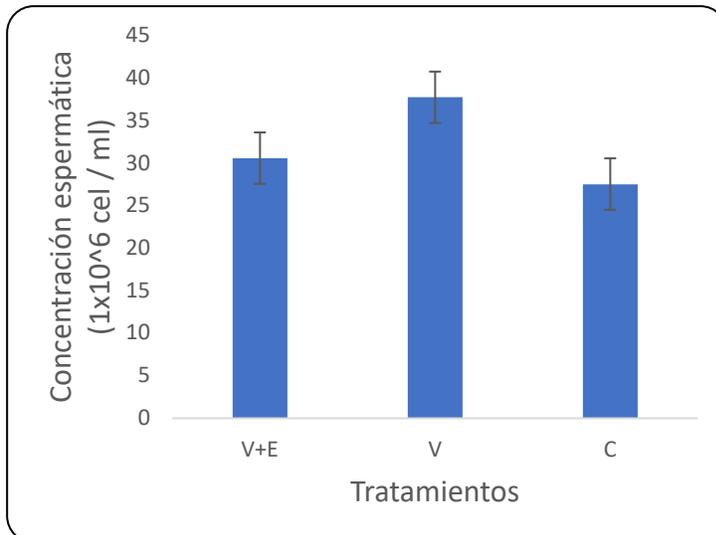


Figura 19. La presencia de antioxidante no afecta la concentración espermática después de la congelación. Aunque se observa una concentración ligeramente mayor de células en los tratamientos V+E y V, en comparación al tratamiento C, no existe una diferencia significativa entre ellos. El análisis se hizo mediante el sistema CASA (n =19). La ANOVA de una vía reportó que no existe diferencia en la concentración y los tratamientos (p = 0.5484).

6.3.2 *LensHooke*

De igual forma se evaluó la concentración en el equipo LensHooke® después del proceso de criopreservación para cada tratamiento. Se tomó el valor dado por el sistema CASA de la concentración previa al tratamiento de criopreservación para hacer la comparación entre antes y después del tratamiento, debido a que por cuestiones de costo, no se utilizó el equipo LensHooke® para la medición inicial.

En a **Figura 20** se muestra que existe diferencia significativa en la concentración antes y después de la congelación de forma similar a lo reportado por el sistema CASA. También se evaluaron por separado los tratamientos V+E y V para discriminar de mejor manera si existe o no una diferencia en la concentración de espermatozoides. No se encontró diferencia significativa ante la presencia o ausencia de EmbryORP® (**Figura 21**) aunque la vitrificación sin suplemento dio mayor número de células, similar a lo observado por el sistema CASA.

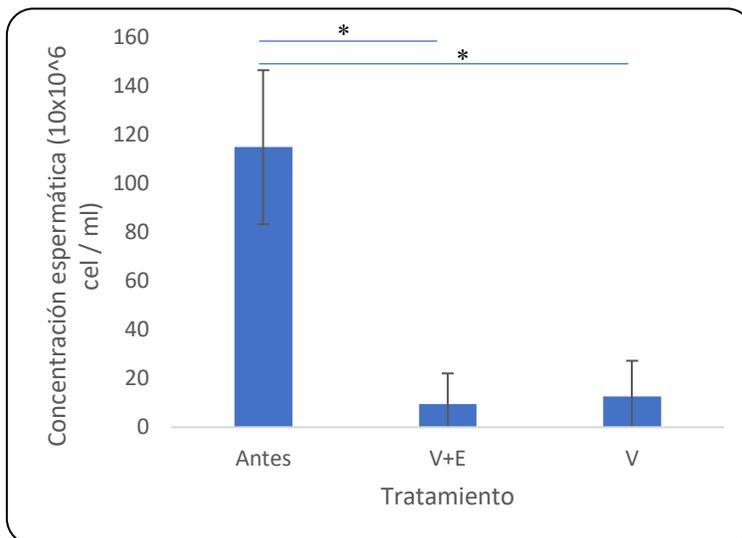


Figura 20. La concentración de espermatozoides se ve disminuida después del proceso de congelación. Aunque se observa una concentración ligeramente mayor de células en los tratamientos V+E y V, en comparación al tratamiento C, no existe una diferencia significativa entre ellos. El análisis se hizo mediante LensHooke® y el sistema CASA (n =19). La ANOVA de una vía reportó una diferencia significativa antes y después de la congelación ($p < 0.0001$).

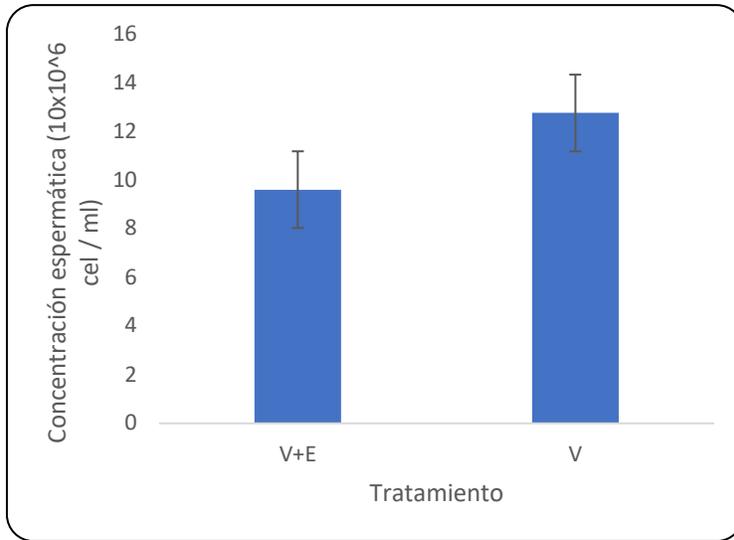


Figura 21. **La presencia de EmbryoORP® no afecta la concentración espermática después de la congelación.** Aunque se observa una concentración ligeramente mayor de células en el tratamiento sin antioxidante, no existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos. El análisis se hizo mediante LensHoke (n =19) La prueba de *Mann-Whitney* reportó qu no hay diferencia en la concentración y ambos tratamientos (p = 0.2050).

6.4. Morfología

Se analizó la morfología de los espermatozoides desvitrificados en presencia y ausencia antioxidante a través del equipo LensHooke®. Se encontró que existe diferencia significativa en el porcentaje de células con morfología óptima entre ambos tratamientos. (Figura 22). Este porcentaje fue mayor en el tratamiento vitrificado sin suplemento.

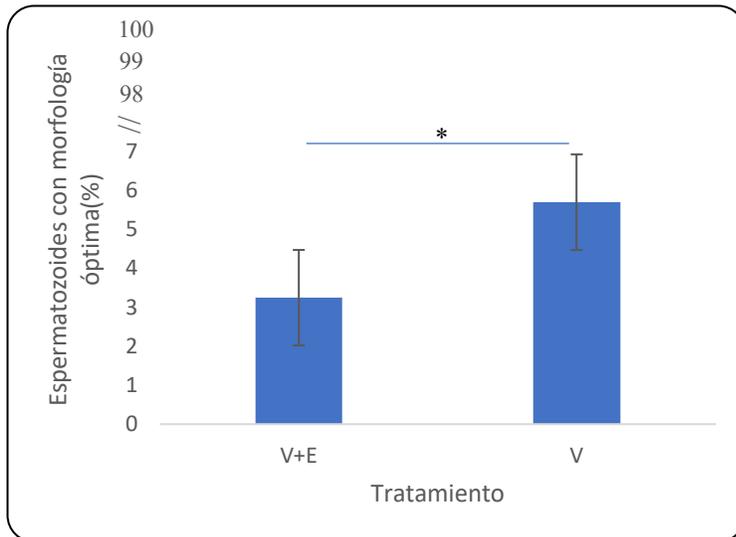


Figura 22. **Existe un mayor número de espermatozoides con morfología óptima después de la criopreservación en ausencia de antioxidante.** El porcentaje de espermatozoides con buena morfología fue mayor después del proceso de congelación en el tratamiento sin antioxidante. El análisis se hizo en el equipo LensHooke® (n = 19). La prueba *T-student* reportó que existe una diferencia entre la morfología y ambos tratamientos (p = 0.0477).

Figura 23. El dispositivo LensHooke® carece de la resolución suficiente para discriminar entre las distintas morfologías que puede presentar el espermatozoide. Sin

embargo, toma fotografías y hace un promedio del largo, ancho de la cabeza y largo de la cola para compararlo con un valor fijo establecido por la OMS (**Tabla 3**) (WHO, 2010). De esta forma determina el grado de morfología en las células.

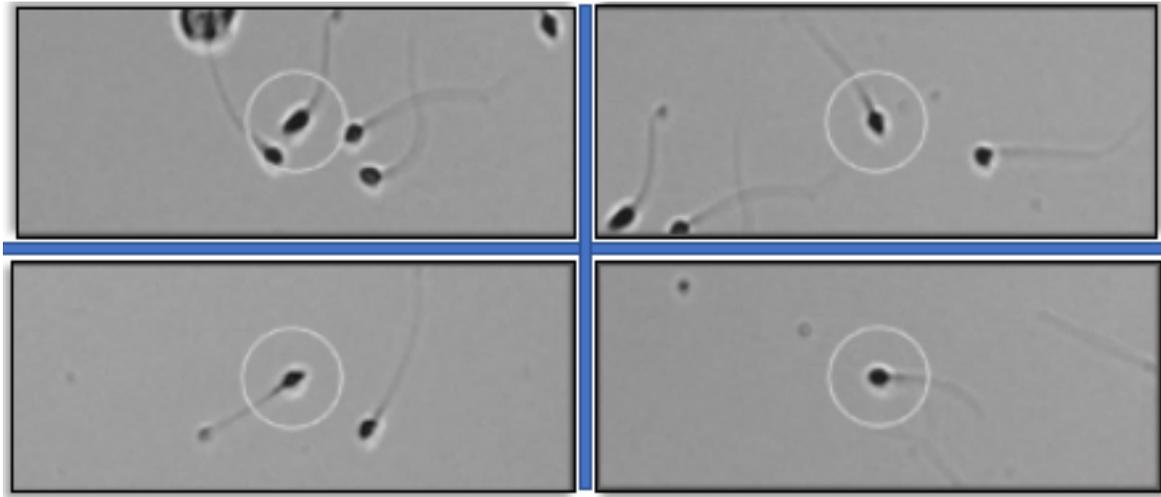


Figura 23. Fotografías representativas tomadas por el LensHooke® para determinar la morfología de los espermatozoides.

6.5 pH

En la **Figura 24** se muestra el valor de pH del medio una vez desvitrificados los espermatozoides. Se encontró que existe diferencia significativa en el pH del medio influenciado por la presencia de EmbryORP®. El tratamiento sin antioxidante tuvo valores más cercanos a un pH fisiológico, mientras que la presencia de EmbryORP® lo disminuyó a valores cercanos a 7.

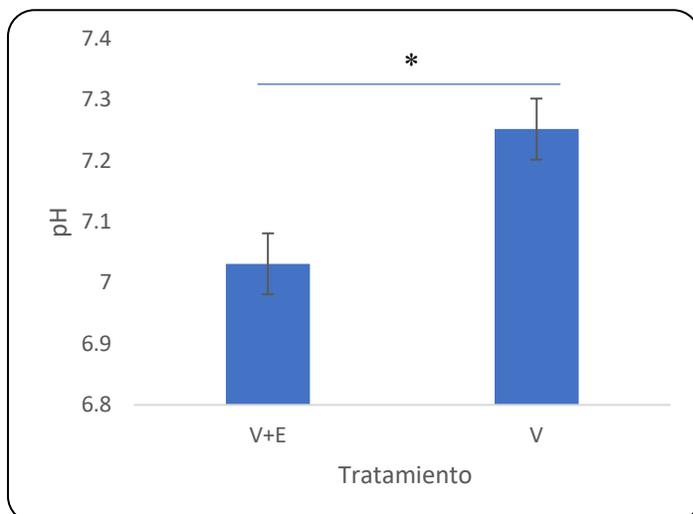


Figura 24. La presencia de EmbryoORP® reduce el pH del medio una vez desvitrificados los espermatozoides. Sin antioxidante el valor del pH es más fisiológico cercano a 7.4 mientras que la presencia de EmbryoORP® lo disminuye. El análisis se hizo en el equipo LensHooke® (n = 19). La prueba de *T-student* reportó que existe diferencia significativa entre los tratamientos (p = 0.0003).

6.6. Potencial de óxidoreducción

Se evaluó el potencial de óxido-reducción en espermatozoides desvitrificados con y sin antioxidante mediante el equipo MiOXSYS®. Para el tratamiento V+E se reservó una alícuota de 150 µl de muestra que se resuspendió, después de la centrifugación, en medio HTF sin suplemento para calcular el valor de ORP de las células. Se normalizó el valor de ORP dividiendo entre la concentración de células (1×10^6 células / ml) y se reportan los valores como $\frac{mv}{10^6 \text{ células} \times ml}$.

En la **Figura 25** se observa que existe una diferencia significativa en el potencial de los espermatozoides suplementados con EmbryoORP® en comparación con aquellos sin el suplemento. La presencia del antioxidante disminuye el ORP de las células.

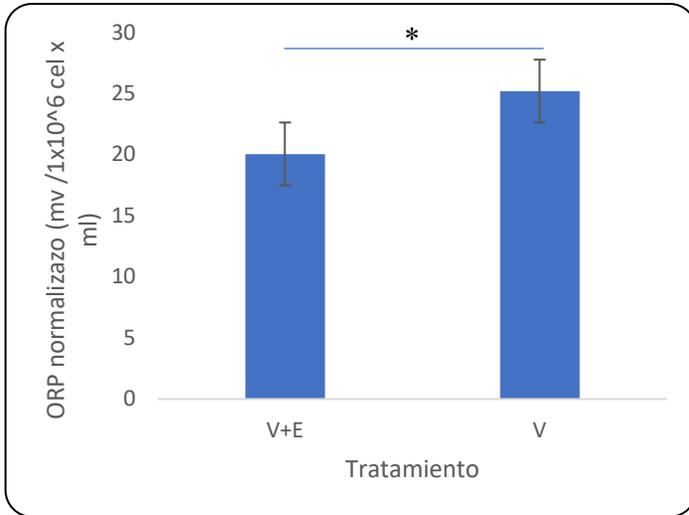


Figura 25. El ORP de espermatozoides posterior a la criopreservación se ve disminuido en presencia de EmbryORP®. Se encontró una diferencia significativa en el ORP de espermatozoides vitrificados en presencia de antioxidante. El análisis se hizo mediante el equipo LensHooke® (n = 19). La prueba de *Mann-Whitney* reportó que existe una diferencia entre los tratamientos y el ORP (p < 0.0138).

6.7. Reacción acrosomal

Se evaluó el estado del acrosoma de los espermatozoides después del proceso de congelación para los tres tratamientos. En la **Figura 26** se observa que hay un menor porcentaje de RA en el tratamiento V+E, a diferencia de los tratamientos V y C con valores similares entre sí.

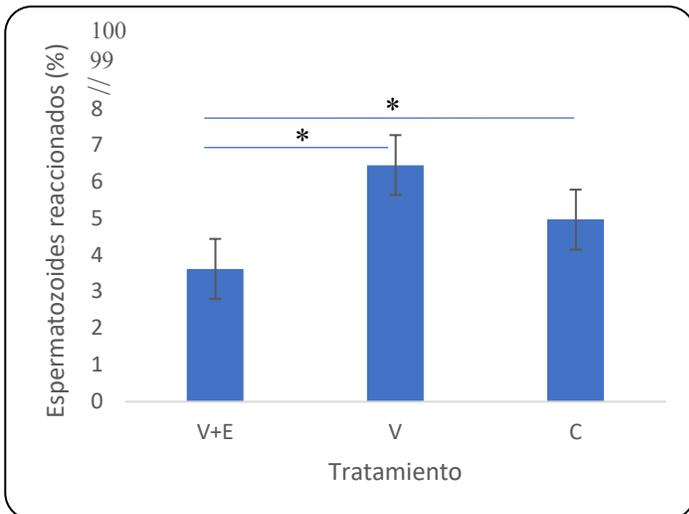


Figura 26. El antioxidante EmbryORP® preserva mejor el acrosoma de espermatozoides posterior a la criopreservación. Se encontró una diferencia significativa en el estado del acrosoma en los espermatozoides vitrificados en presencia del antioxidante con aquellos vitrificados sin suplemento y congelados de forma lenta. El análisis se hizo mediante citometría de flujo (n = 16). La ANOVA de una vía reportó que existe una diferencia en el estado del acrosoma del tratamiento V+E con V y C (p < 0.001).

En los experimentos de RA se incluyeron ionomicina y DMSO como control es positivo y negativo, respectivamente. El ionóforo aumentó de forma significativa el número

de células reaccionadas a pesar de tratarse de células no capacitadas. En cambio, el porcentaje de reacción con DMSO fue similar al valor de reacción espontánea. Ver Apéndice 3.1.

6.8. Potencial de membrana mitocondrial

El último parámetro evaluado fue el PMM tiñendo las células con JC-1. Se encontró que los espermatozoides vitrificados en presencia de EmbryoORP® tienen un menor porcentaje de células con alto potencial mitocondrial, en comparación a la vitrificación sin suplemento y la congelación lenta; estos dos últimos tratamientos sin diferencia significativa (**Figura 27**).

Una vez realizada la medición de PMM se añadió CCCP como control positivo esperando que disminuyera la fluorescencia de color rojo, y se concentrara la fluorescencia en color verde, característico de células con bajo PMM. Esto con la finalidad de comprobar que los cambios observados reflejaran el PMM de los espermatozoides. Ver apéndice 3.2.

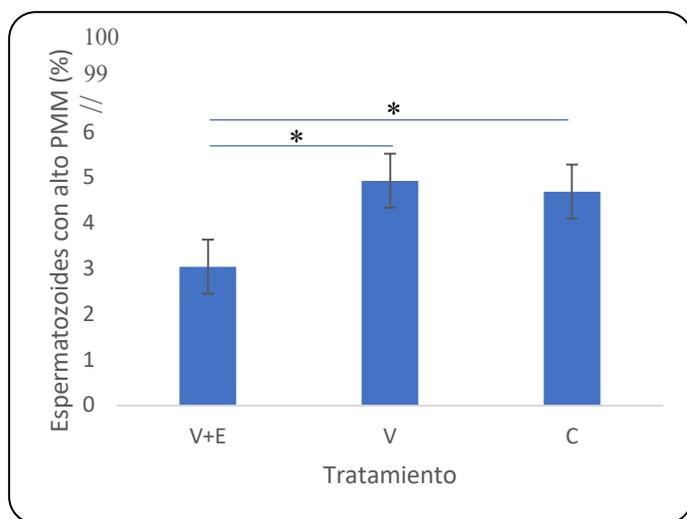


Figura 27. **El antioxidante EmbryoORP® disminuye el PMM de espermatozoides posterior a la criopreservación.** El tratamiento de vitrificación con antioxidante dio como resultado un número menor de células con bajo PMM a diferencia de los dos tratamientos restantes. El análisis se hizo mediante citometría de flujo (n = 16). La ANOVA de una vía reportó que el tratamiento V+E es diferente a los tratamientos V y C ($p < 0.0485$)

Capítulo VII

Discusión

Además de su potencial en otras áreas, la criopreservación de espermatozoides ha sido durante mucho tiempo, una gran herramienta para combatir la infertilidad masculina y para lograr el embarazo de mujeres que así lo desean, a través de TRA (Barbas & Mascarenhas, 2009).

A pesar del éxito de las técnicas actuales de criopreservación como la congelación y vitrificación, durante el proceso los efectos osmóticos y biofísicos reducen, además de la concentración y vitalidad, la capacidad fecundante de los espermatozoides por el deterioro en las membranas celulares, la motilidad, daños al acrosoma y otros parámetros que afectan su integridad estructural y funcional (Lin *et al.*, 1998). Además, el evento de congelación es una situación estresante en donde las células a menudo sufren también daño atribuido a la generación de ROS (Thomson *et al.*, 2009).

En este trabajo se abordó la problemática planteada al probar el kit comercial de vitrificación Easy-Sperm[®] suplementado con el antioxidante EmbryoORP[®] para evaluar diferentes parámetros de fecundidad, en comparación a la congelación lenta.

A diferencia de lo reportado por Aizpurua y colaboradores (2017) se encontró una baja motilidad en los tratamiento V+E y V, en comparación a la congelación lenta. Esta baja motilidad se puede deber al bajo PMM dado por el EmbryoORP[®].

Se ha observado que, en el espermatozoide de ratón y humano, el PMM está directamente relacionado con la motilidad. Espermatozoides con alto PMM son

morfológicamente normales con una alta capacidad de producción de ATP y por tanto alta motilidad (Agnihotri *et al.*, 2016). Los espermatozoides congelados carecen del antioxidante y por tanto reportan una mayor motilidad PR y NP. Se observa lo mismo al comparar los tratamientos V+E y V, donde la vitrificación sin el suplemento da una mayor motilidad a las células después del proceso de congelación.

Se ha demostrado que existe una fuerte correlación positiva entre el PMM y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Suski *et al.*, 2011). Esto debe a que el PMM determina el gradiente electroquímico en la matriz de la mitocondria que permite la síntesis de ATP. Ante un bajo PMM se produce menos energía y también menor concentración ROS, lo cual disminuye el valor de ORP (Agarwal *et al.*, 2016); tal y como se muestra en la **Figura 22** el EmbryoORP® disminuyó el valor de ORP.

Esto también va en concordancia con el valor de pH ya que se ha reportado que una alcalinización del medio induce la producción de ROS (Selivanov *et al.*, 2008). El tratamiento de V tiene un pH más alcalino, por tanto, un mayor ORP y una mayor concentración de ROS. Además, el pH juega un papel importante en la motilidad. Chen y colaboradores (2014) evaluaron el efecto de diferentes valores de pH sobre la motilidad y otros parámetros, y concluyen que la motilidad alcanza un pico máximo a un pH de 7.2, pero declina a valores más ácido y alcalinos.

Esta baja concentración de ROS puede explicar la preservación del acrosoma observada en el tratamiento V+E. Los espermatozoides son altamente susceptibles a las ROS debido a la composición específica en su membrana plasmática, ya que contienen ácidos grasos poliinsaturados, que son estructuralmente inestables y propensos a la peroxidación lipídica (Agarwal & Danh Bui, 2017). Esto podría explicar por que hay una menor tasa de

RA espontánea en las células vitrificadas con el antioxidante. Zhang y colaboradores (2019) reportó que espermatozoides con bajo PMM tuvieron una tasa baja de RA, lo cual va acorde a los resultados obtenidos.

Está reportado que los espermatozoides vitrificados tienen un mayor porcentaje de vitalidad (Aizpurua *et al.*, 2017), sumado a esto con la menor cantidad de ROS era de esperar que hubiera una mayor supervivencia en el tratamiento de vitrificación con el antioxidante. Sin embargo, y para nuestra sorpresa, no fue así. Incluso, la mayor tasa de mortalidad se observó en el tratamiento V+E. Esto se puede deber a que existe un delicado equilibrio entre las ROS y los antioxidantes para proteger a la célula de las lesiones oxidativas y tener una buena actividad fisiológica (Wagner *et al.*, 2018). Es posible que la cantidad de antioxidante utilizada baje a niveles críticos la concentración de las ROS y esto repercuta en la vitalidad celular ya que sirven como mensajeros celulares (Zorov *et al.*, 2014).

Este balance crítico entre las ROS y la capacidad antioxidante de la célula puede verse implicado en otros parámetros como la concentración y morfología de los espermatozoides. Aunque se esperaba lo contrario, se encontró que en ambos casos la presencia de EmbryoORP® tiene efectos negativos en las células. Una vez más, es factible que la cantidad de antioxidante utilizada no sea la adecuada.

De igual forma es importante considerar el hecho que los procesos de criopreservación, por lo general, disminuyen la capacidad antioxidante de los espermatozoides. Esto se hace al diluir el semen en algún medio especial, lo cual baja la concentración de especies antioxidantes endógenas que ayudan a mitigar la generación de ROS como son las enzimas la SOD, GPx y CAR (Liu *et al.*, 2018), y también moléculas no enzimáticas como el glutati6n (Ogata *et al.*, 2015) o la vitamina E (Pahune *et al.*, 2013).

El estilo de vida del donador también influye en la concentración de ROS en el líquido seminal. Se ha reportado que las ROS puede derivar de fuentes externas como la contaminación, alcohol, tabaco, metales pesados y algunas drogas que afecten la capacidad antioxidante natural del semen (Phaniendra *et al.*, 2015). Los protocolos de congelamiento utilizados hacen uso del semen total de la muestras, mientras que otros protocolos separan las células del resto del líquido seminal para quedarse con los espermatozoides más aptos (Mohamed, 2015). En un trabajo futuro podría hacer caso de estos protocolos y procesar únicamente los espermatozoides y ver su impacto.

En 2017 Aizpurúa y colaboradores compararon diferentes parámetros de fertilidad de espermatozoides congelados de manera lenta y vitrificados, con el kit Easy-Sperm®. Entre estos parámetros evaluaron la morfología y la concentración. Ellos reportaron una mejora en los espermatozoides vitrificados. Nuestros resultados van acorde a este trabajo, donde se obtuvo una mayor concentración espermática con el tratamiento V.

Se observó un menor porcentaje de células con morfología óptima en el tratamiento V+E, pero las dimensiones de la cabeza y de la cola entre los tratamientos V+E y V fue similar. Esto indica que la morfología no se ve afectada por la presencia del antioxidante. Lo más seguro es que esto se deba a una menor concentración espermática en el tratamiento V+E que repercute directamente en la proporción de células con morfología óptima detectada por el equipo. Al comparar los valores obtenidos con los valores establecidos por la OMS (**Tabla 3**) se encontró una diferencia significativa para ambos tratamientos. Esto indica que es el proceso de vitrificación lo que daña la morfología celular y no la presencia de EmbryoORP® (**Figura 28**).

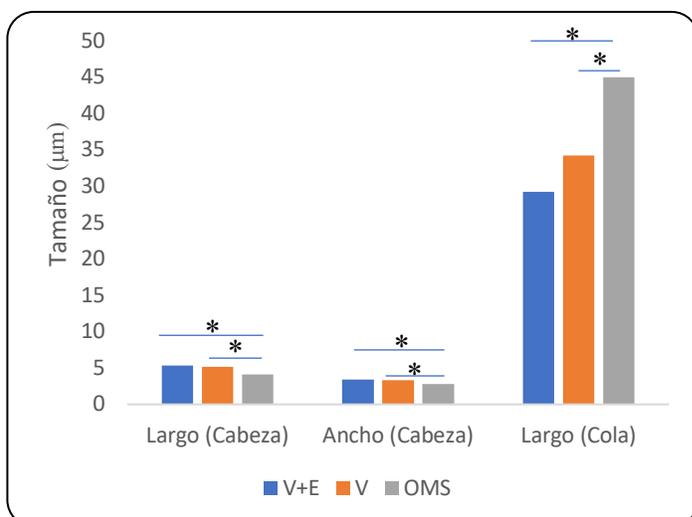


Figura 28. La morfología de los espermatozoides no se ve afectada por la presencia de EmbryoORP®, pero sí ante la vitrificación. Las dimensiones de la cabeza y de la cola de los espermatozoides fue similar sin importar la presencia o ausencia de antioxidante, sin embargo, fueron significativas en comparación al valor establecido por la OMS como un valor óptimo para el tamaño de la cabeza y la cola. (n = 19) Las pruebas ANOVA reportaron que existe una diferencia significativa entre los tratamientos con el valor establecido por la OMS ($p < 0.0001$ para cada prueba).

Tabla 3. Promedio de las dimensiones de la cabeza y la cola de los espermatozoides (µm) después de la vitrificación en presencia y ausencia de antioxidante EmbryoORP® comparado con el valor establecido por la OMS.

| Tratamiento | Largo de la cabeza (µm) | Valor establecido por la OMS (µm) | Ancho de la cabeza (µm) | Valor establecido por la OMS (µm) | Largo de la cola (µm) | Valor establecido por la OMS (µm) |
|-------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| V+E | 5.3 | 4.1 | 3.4 | 2.8 | 28.22 | 45 |
| V | 5.19 | | 3.32 | | 34.22 | |

Lamentablemente no se pudo comparar el efecto de la vitrificación y congelación con la morfología, sin embargo, es importante tener en cuenta que la formación de cristales de hielo es el principal factor que afecta físicamente la morfología y la integridad de la estructura de los espermatozoides. Durante la congelación lenta ocurren eventos de osmosis que alteran la estructura de la célula, mientras que la vitrificación evade este problema con un descenso drástico de la temperatura. Por ello resulta prudente también evaluar este parámetro para conocer el efecto de ambos procesos de criopreservación sobre las células.

Capítulo VIII

Conclusiones

1. La vitrificación con EmbryoORP® disminuyó la motilidad PR y NP.
2. La vitrificación con EmbryoORP® tuvo menor vitalidad en comparación a la vitrificación sola y la congelación lenta.
3. La presencia de EmbryoORP® no afectó la concentración espermática durante el proceso de vitrificación.
4. La presencia de EmbryoORP® no altera la morfología de los espermatozoides, pero la vitrificación si.
5. La presencia de EmbryoORP® neutraliza el pH del medio celular.
6. La presencia de EmbryoORP® disminuye el ORP.
7. La vitrificación con EmbryoORP® preserva mejor el acrosoma a diferencia de la vitrificación sola y la congelación lenta.
8. La vitrificación con EmbryoORP® tiene como resultado menor PPM en comparación con la vitrificación sola y la congelación lenta.

Capítulo IX

Perspectivas

- ◇ Como perspectivas de este trabajo considero que para conocer el verdadero impacto del antioxidante sobre las células hace falta añadir dos tratamientos más: 1) Frescos y 2) Congelación lenta + EmbryORP®. Con estos tratamientos se podría evaluar las células antes y después del proceso de congelación y saber si los resultados observados se deben al antioxidante, o a la criopreservación que sufrieron las células.
- ◇ Es importante también evaluar los protocolos de criopreservación en espermatozoides separados del semen.
- ◇ Considero importante evaluar la actividad del antioxidante sobre espermatozoides astenospérmicos y oligoatenospérmicos para conocer su potencial médico.
- ◇ Por último, evaluar los espermatozoides vitrificados en presencia de EmbryORP® en experimentos de inseminación artificial y evaluar alteraciones en los embriones derivadas del antioxidante.

Capítulo X

Literatura citada

1. Aizpurua, J., Medrano, L., Enciso, M., Sarasa, J., Romero, A., Fernández, M., & Gómez-Torres, M. (2017). New permeable cryoprotectant-free vitrification method for naive human sperm. *Human Reproduction*. 32(10). doi: 10.1093/humrep/dex281.
2. Agarwal, A., & Danh Bui, A. (2017). Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility. *Investing Clin Urol*. 58(6): 385 – 399. doi: 10.4111/icu.2017.58.6.385.
3. Agarwal, A., Roychoudhury, S., Bjugstad, K., & Cho, C. (2016). Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? *Therapeutic Advances in Urology*. 8(5): 302 – 318. doi: 10.1177/1756287216652779.
4. Agarwal, A., Roychoudhury, S., Sharma, R., Gupta, S., Majzoub, A., & Sabanegh, E. (2016). Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 34(1): 48 – 57. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.10.008.
5. Agarwal, A., Sharma, R., Roychoudhury, S., Plessis, S., & Sabanegh, E. (2016). MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen

- and seminal plasma. *Fertility and Sterility*. 106(3): 566 – 574. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.05.013.
6. Agnihotri, S., Agrawal, A., Hakim, B., Vishwakarma, A. L., Narender, T., Sachan, R., & Sachdev, M. (2016). Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29(9): 953 – 960. doi:10.1007/s11626-016-0061-x.
 7. Alberts, B., Johnson, A. & Lewis, J. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science: New York, USA. pp 813 – 827.
 8. Amidi, F., Pazhohan, A., Nashtaei, M. S., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking*. 17(4): 745- 756. doi: 10.1007/s10561-016-9566-5.
 9. Andrabi, S. & Maxwell, W. (2007). A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*. 99: 223-243. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.07.002.
 10. Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano J., & Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57(4): 291 – 300.
 11. Baena, M.L, Halffter, G. (2008). Extinción de especies, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, pp. 263-282.
 12. Barbas, J. P. & Mascarenhas, R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10: 49-62. doi 10.1007/s10561-008-9081-4.

13. Baxter, S. J., & Lathe, G. H. (1971). Biochemical effects on kidney of exposure to high concentrations of dimethyl sulphoxide. *Biochemical Pharmacology*, 20 (6), 1079 – 1091. doi: 10.1016/0006-2952(71)90337-6.
14. Berrios, O. & Sánchez, R. (2011). Congelación Ultra Rápida de Espermatozoides Humanos: Efecto sobre la Función Espermática y Producción de Especies Reactiva de Oxígeno. *International Journal of Morphology*. 29(3): 899-906.
15. Berrios, O., Valdebenito, I., Treulén, F., & Ubilla, A. (2010). Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): Efectos en la motilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42: 179-186.
16. Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P. & Passegué, E. (2011). DNA-Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cell. *Cell Press*. 8: 16-29. doi: 10.1016/j.stem.2010.12.012.
17. Brent, R. (2014). Protection of the gamete's embryo/fetus from prenatal radiation exposure. *Health Physics Society*. 242-274. doi: 10.1097/HP.0000000000000235.
18. Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 54(4): 227-248.
19. Brugh, V., & Lipshultz, L. (2004). Male factor infertility: Evaluation and management. *The Medical Clinics of North America*. 88:367-385. doi: 10.1016/S0025-7125(03)00150-0.
20. Burgstaller, S., Bischof, H., Gensh, T., Stryeck, S., Gottschalk, B., Ramadani-Muja, J., Eroglu, E., Rost, R., Balfanz, S., Baumann, A., Waldeck-Weiermair, M., Hay, J., Madl, T., Graier, W., & Malli, R. (2019). pH-Lemon, a Fluorescent Protein-Based

- pH Reporter for Acidic Compartments. *ACS Sensors*. 4(4): 883- 891. doi: 10.1021/acssensors.8b01599.
21. Cabrera, P., Sánchez, R. & Risopatrón, J. (2014). Selección Espermática en Semen Congelado/Descongelado de Equino: Evaluación de las Membranas Plasmática, Acrosomal y Potencial de Membrana Mitocondrial. *International Journal of Morphology*. 32(2): 725-731. doi: 10.4067/S0717-95022014000200057.
22. Caldentey, D. (2017). La industria de la reproducción asistida mueve cifras récord: 530 millones al año. *La Información*. Recuperado el 29 de agosto de 2018. Disponible en: [<https://www.lainformacion.com/actualidad/la-industria-de-la-reproduccion-asistida-mueve-cifras-record-530-millones-al-ano/6335199>].
23. Cánovas, S. & Coy, P. (2008). Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. *Revista de Investigación Clínica*. (60)5: 403-413.
24. Carballo, E, Campos, J., Reyes, H. & Kably, A. (2011). Comparación de tres métodos de capacitación espermática para ICSI en pacientes con morfología anormal. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 4(2): 68-71.
25. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkeak, N. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medicine Journal*. 305: 609-613.
26. Casillas, F., Betancurt, M., Cuello, C., Ducolomb, Y., López, A., Juárez-Rojas, L. & Retana-Márquez, S. (2018). An efficiency comparison of different *in vitro* fertilization methods: IVF, ICSI, and PICSII for embryo development to the blastocyst stage from vitrified porcine immature oocytes. *Porcine Health Management*. 4(16). doi: 10.1186/s40813-018-0093-6.

27. Chen, L., Ge, Y., Liang, Y., & Yao, B. (2104). AB185. Semen pH effects sperm motility and capacitation by influencing Na/K-ATPase activity and Ca⁺ concentration in spermoplasm. *Translational Andrology and Urology*. 3(1); AB185. doi: 10.3978/j.ssn.2223-4683.2014.s185.
28. Cisternas, L. (2009). Diagramas de fases y su aplicación. Barcelona: Reverté. pp 18.
29. Copper, G. M. & Hausman, R., E. (2013). THE CELL A Molecular Approach 6th Edition. Boston: Sinaur Associates. pp 421- 431.
30. Cooper, T. & Hellenkemper, B. (2009). Method-Related Estimates of Sperm Vitality. *Journal of Andrology*. 30(3): 214-218. doi: 10.2164/jandrol.108.005819.
31. Cooper, T., Noona, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Gordon-Baker, H.W., Behre, H., Mbizo, M. & Vogelsong, K. (2010). World Health Organization refrence calues for human semen characteristics. *Human Reproduction*. 16(3): 231-245.
32. Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T. & Treviño, C. (2001). Ion Transport in Sperm Signaling. *Developmental Biology*. 240: 1-14. doi: 10.1006/DBIO.2001.0387.
33. Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. & Espinosa, F. (1999). Ion Channels in Sperm Physiology. *American Physiological Society*.79(2): 481-510. doi: 10.1152/physrev.1999.79.2.481.
34. Darzon, A., Nishigaki, T., Beltrán, C. & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*. 91: 1305 – 1355. doi: 10.1152/physrev.00028.2010.

35. Darzon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C. L., Felix, R., & Beltrán, C. (2005). Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *International Review Cytology*. 243, 79 – 172.
36. De Blas, G., Darszon, A., Ocampo, A.Y., Serrano, C., Castellano, L.E., Hernández-González, E.O., Chirinos, M., Larrea, F., Beltrán, C., & Treviño, C. L. (2009). TRPM8, a Versatile Channel in Human Sperm. *PLoS ONE*. 4(6): 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0006095.
37. DeJarnette, J.M. (2004). Industry Application of Technology in Male Reproduction. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. 201-218.
38. Del Río, M.J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M., Moreno, R., & Vigil, P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*. 5(4): 368-373. doi: 10.16/S1698-031x(07)74086-4.
39. Evenson, D., Jost, L. Marshall, D., Zinaman, M., Clegg, E., Purvis, K., Angelis, P. & Claussen, O. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*. 14(4): 1039-1049.
40. Fahy, G., & Wowk, B. (2014). Principles of Cryopreservation by Vitrification. *Methods in Molecular Biology*. 21 – 82. doi:10.1007/978-1-4939-2193-5_2.
41. Fernández-Muerza, A. (2010). Criopreservación de especies amenazadas. La congelación de material genético y la reproducción asistida han alejado a diversos seres de su extinción. Consumer. Recuperado el 30 de agosto de 2018. Disponible en:[http://www.consumer.es/web/es/medio_ambiente/naturaleza/2010/09/02/195520.php].

42. Fontoura, P., Mello, M. D., Gallo-Sá, P., Erthal-Martins, M.C., Almedida, M.C., & Ramos, C. (2016). Leptin Improves Sperm Cryopreservation via Antioxidant Defense. *Journal of Reproduction and Infertility*. 18(1): 172 – 178.
43. Garsi, J.P., Schlumberger, M., Ricard, M., Labbé, M., Ceccarelli, C., Schwartz, C., Henry-Amar, M., Bardet, S., Rubino, C. & Vathaire, F. (2009). Health outcomes of children fathered by patients treated with radioiodine for thyroid cancer. *Clinical Endocrinology*. (6): 880 – 883. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03561.x.
44. Generoso-Marroquino, M. (2016). Causas, factores predisponentes y consecuencias de la infertilidad sobre la relación de pareja. Trabajo Final de Grado. Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias de la Salud. Jaén, Andalucía. pp 10 - 15.
45. Gharajelar, S. N., Sadrkhanloo, R. A., Onsori, M., & Saberivand, A. (2016). A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Veterinary Research Forum*. 7(3): 235 – 239.
46. Graham, J.K. (2008). Industry Application of Technology in Male Reproduction. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. Colorado, USA.
Documento en PDF disponible en:
[https://beefrepro.unl.edu/proceedings/2008ftcollins/14_csu_maletch_graham.pdf]
47. Green, D., Zevon, M., Lowrie, G., Seigelstein, N. & Hall, B. (1991). Congenital anomalies in children of patients who received chemotherapy for cancer in childhood and adolescence. *Journal of Medicine*. 325(3): 141-146. doi: 10.1056/NEKM199107183250301.
48. Harper, C., Barratt, C., Publicover, S. & Kirkman-Brown, J. (2006). Kinetics of the Progesterone-Induced Acrosome Reaction and its Relation to Intracellular Calcium

- Responses in Individual Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. (75): 933-939. doi: 10.1095/biolreprod.106.054627.
49. Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breibart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*. 14: 816 - 821. doi: 10.1038/aja.2012.81.
50. Jausoro A. (2005). Reproducción Humana Asistida: Descripción de las opciones terapéuticas disponibles. Vitoria-Gasteiz. Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, 2000. Informe n°: Osteba E-00-05.
51. Konc, J., Kanyó, K., Kriston, R., Somoskoi, B., & Cseh, S. (2014). Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. *BioMed Research International*. 1 – 9. doi: 10.1155/2014/307268.
52. Kotwicka, M. Skibinska, I., Jendraszak, M. & Jedrzejczak, P. (2016). 17B-estradiol modifies human spermatozoa mitochondrial function in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 14-50. doi: 10.1186/s12958-0186-5.
53. Kupka, M., Ferraretti, A., Mouzon, J., Erb, K., Hooghe, T., Castilla, J., Calhaz1-Jorge, C., Geyter, C., Goossens, V. & EIM & ESHRE. (2014). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. 29(10): 2099-2113.
54. Kovac, J., Smith, R., Cajipe, M., Lamb, D. & Lipshultz, L. (2017). Men with a complete absence of normal sperm morphology exhibit high rates of success without assisted reproduction. *Asian Journal of Andrology*. 19: 39 – 42. doi: 10.4103/1008-682X.189211.

55. Lessells, C., Snook, R. & Hosken. (2009). The evolutionary origin and maintenance of sperm: selection for a small, motile gamete mating type, en Sperm Biology. *An Evolutionary Perspective. Academic Press: UK.* PP 43-67.
56. Lin, M., Morshedi, M., Srisombut, C., Nassar, A., & Oehninger, S. (1998). Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test and eodin-Y staining. *Fertility and Sterility.* 70(6): 1148-1155.
57. Liu, J., Wang, W., Liu, X., Wang, X., Wang, J., Wang, Y., Li, N. & Wang, X. (2018). Supplementation of cryopreservation medium with TAT-Peroxiredoxin fusion protein improves human sperm quality and function. *Fertility and Sterility.* 110(6): 1058-1066. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.07.008.
58. Lombardi, J. (1998). Gametes and their production, en Comparative Vertebrate Reproduction. Springer Science Business Media: EU. pp 108- 153.
59. Mascarenhas, M., Flaxman, S., Boerma, T., Vanderpoel, S. & Stevens, G. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *Plos Medicine.* 9(12): 1-12. doi: 10.1371/journal.pmed.1001356.
60. Massignam, E., Ferreira, Maitè, Sanguinet, E., Dupont, A., Klamt, F., Frantz, N., & Bos-Mikich, A. (2018). Antidant defense capacity of ovarian tissue after vitrification in a metal closed system. *JBRA Assisted Reproduction.* 22(3): 199 – 204. doi: 10.5935/1518-0557.20190044.
61. Mendoza, J.L., Castilla, J.A, Martínez, L, Magán, R., García-Peña, M.L, Ortiz, A., González, E., Fontes, J., Maldonado, V., Mendoza, V., & Ortiz de Galisteo, J.R.

- (2003). Crioconservación de semen en pacientes oncológicos: 17 años de experiencia. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 20(3): 193-199.
62. Menkveld, R., Holleboom, C. & Rhemrev, J. (2011). Measurement and significance of sperm morphology. *Asian Journal of Andrology*. 13: 59 – 68. doi: 10.1038/aja.2016.67.
63. Merino, O. Aguagüina, W. E., Esponda, P., Risopatrón, J., Isachenko, E., Isachenko, V., & Sánchez, R. (2013). Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique. *Andrologia*. 47(2): 186 – 193. doi: 10.1111/and.12246.
64. Meseguer, M., Molina, N., García-Velasco, J., Remohí, J., Pellicer, A. & Garrido, N. (2006). Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study. *Fertility and Sterility*. 85(3): 640-645.
65. Mohamed, M. (2015). Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. *Iran Journal of Reproductive Medicine*. 13(10): 633-644.
66. Moskovtsev, S. & Librach, H. (2013). Chapter 2: Methods of Sperm Vitality Assessment. En: *Spermatogenesis. Methods and Protocols*. Humana Press: USA. pp 13-21.
67. Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in Sperm Physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 450 (3): 1149 – 1158. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.100.
68. Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A. & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 19 (4): 426-436.

69. Ogata, K., Sasaki, A., Kato, Y., Takeda, A., Wakabayashi, M., Sarentonglaga, B., Yamaguchi, M., Hara, A., Fukumori, R. & Nago, Y. (2015). *Journal of Reproduction and Development*. 61(2): 116 – 122. doi: 10.1262/jrd.2014-130.
70. Ozkavukeu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztune, D. & Karahuseyinoglu, S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 25:403-11. doi: 10.1007/s10815-008-9232-3.
71. Pahune, P. P., Choudhari, A. R. & Muley, P. A. (2013). The Total Antioxidant Power of Semen and its Correlation with the Fertility Potential of Human Male Subjects. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 7(6): 991 – 995. doi: 10.7860/JCDR/2013/4974.3040.
72. Pegg, D. E. (2007). Principles of Cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*. 39 – 57. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_3.
73. Pesch, S & Hofmann, B. (2007). Cryopreservation of Spermatozoa in Veterinary Medicine. *Journal of Reproductions Medicine and Endocrinology*. 2: 101-105.
74. Phaniendra, A., Jestabi D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30 (1): 11 – 26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
75. Porcu, E., Fabbri, R., Damiano, G., Fratto, R., Giunchi, S. & Venturoli, S. (2004). Oocyte cryopreservation in oncological patients. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 113: 14-16. doi: 10.1016/j.ejogrb.2002.11.004.
76. Restrepo-Betancur, G., Cantero-Nanclares, J. & Montoya-Paez, J. (2016). Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos.

- Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 14(1): 119-125. doi: 10.18684/bsaa(14)119-125.
77. Restrepo-Betancur, G., Pizarro-López, E & Rojano, B. (2012). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista de Investigación*. 9(1): 128-136.
78. Restrepo-Betancur, G., Vásquez-Araque, N. & García, E. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Revista CES/ Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 4(2): 119-129.
79. Riva, N., Ruhlmann, C., Iaizzo, R., Marcial-López, C., Martínez, A. (2018). Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for human sperm cryopreservation. *JBRA Assisted Reproduction*. 22(4): 331-337. doi: 10.5935/1518-0557.20180060.
80. Rojas-Quintana, P., Medina-Tío, D. & Torres-Ajá, L. (2011). Revisión Bibliográfica Infertilidad. *Medisur*. 9(4): 340-350.
81. Rosii, T., Mazzilli, F., Delfino, M., & Dondero, F. (2001). Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell and Tissue Bankin*. 2(1): 9 – 13. doi: 10.1023/a:1011592621487.
82. Sánchez, R. & Arboleda, G. (2008). Mitocondria y muerte celular. Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 6 (10). pp 101- 236.
83. Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M., José, O., Treviño, C., Hernández-Cruz, A., & Darszon, A. (2014). Acrosome Reaction and Ca²⁺ Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca²⁺]_i. *Biology of Reproduction*. 91(3): 1-13. doi: 10.1095/biolreprod.114.119768.

84. Selivanov, V., Zeak, J.A., Roca, J., Cascante, M., Trucco, M., & Votyakova, T. (2008). The Role of External and Matrix pH in Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation. *Journal of Biological Chemistry*. 283(43): 29292 – 29300. doi: 10.1074/jcb.M801019200.
85. Senturia, Y., Peckham, C. & Peckham, M. J. (1985). Children fathered by men treated for testicular cancer. *The Lancet*. 766-768. doi: 10.1002/mpo.2950220107.
86. Sieme, H. & Oldenhof, H. (2015). Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock, en *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Human Press: Alemania. pp. 277-289.
87. Sieme, H., Oldenhof, H. & Wolkers, W. (2016). Mode of action of cryoprotectans for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 169: 2-5. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.004.
88. Silva-Villabos, F., Montoya, F., Darszon, A. & Cordiki, G. (2017). Determinación de curvatura de flagelos de espermatozoide en espacio 3D. *Memorias del XXXVIII Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica*. (2)1. doi: 10.24254/CNIB.15.2.
89. Sociedad Española de Fertilidad (SEF). (2011). Saber más sobre Fertilidad y Reproducción Asistida. Documento en PDF consultado el 29 de agosto de 2018. Disponible en: [http://www.sefertilidad.net/docs/pacientes/spr_sef_fertilidad.pdf]
90. Song, B., Jang, S., Kang, S., Wei, H., Jeoun, B., Soon Yoon, U. & Hwang, S. (2017). Modulation of Mitochondrial Membrane Potential and ROS Generation by Nicotinamide in a Manner Independent of SIRT1 and Mitophagy. *Molecular and Cells*. (40)7: 503-514. doi: 10.1438/molcells.2017.0081.
91. Suski, J. M., Lebiezinska, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszynski, J., & Wieckowski, M. R. (2011). Relation Between Mitochondrial Membrane Potential and ROS

- Formation. *Methods in Molecular Biology*. 183 – 205. doi: 10.1007/978-1-61779-382-0_12.
92. Tam Le, M., Nguyen, T., Nguyen, T., Nuguyen, V., Nguyen, T., Nguyen, V., & Cao, N. (2019). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 234: 14 -20. doi:10.1016/jejogrb.2019.01.001.
93. Taylor, K. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*. 18(2): 184- 189. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60254-4.
94. Thomson, L., Fleming, S., Aitken, De luliis, G., Zieschang, J. & Clark, A. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Andrology*. 24(9): 2061-2070. doi: 10.1093/humrep/dep214.
95. Treviño, C.L, Serrano, C.J., Beltrán, C., Felix, R., & Darszon, A. (2001). Identification of mouse *trp* homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *Elsevier Science*. 509: 119-125.
96. Tongdee, P., Sukprasert, M., Satirapod, C., Wongkularb, A. & Choktanasiri, W. (2015). Comparison of Cryopreserved Human Sperm between Ultra Rapid Freezing and Slow Programmable Freezing: Effect on motility, morphology and DNA Integrity. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 98.
97. Troiano, L., Granata, A., Cossarizza, A., Kalashnikova, G., Bianchi, R., Pini, G., Tropea, F., Carani, C. & Franceschi, C. (1998). Mitochondrial Membrane Potencial and DNA Stainability in Human Sperm Cells: A Flow Cytometry Analysis with

- Implications for Male Infertility. *Experimental Cell Research*. 241: 384-393. doi: 10.1006/excr.1998.4064.
98. Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S., & Santiani, A. (2017). Evaluación de la Integridad Acrosomal en Espermatozoides Epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Perú*. 28(1): 130-140. doi: 10.15381/riceo.v28i1.12847/
99. Velde, E., Burdorf, A., Nieschlag, E., Eijkemans, R., Kremer, J., Roeleveld, N. & Habbema, D. (2010). Is human fecundity declining in Western countries? *Human Reproduction*. 25(6): 1348-1353.
100. Wagner, H., Cheng, J., & Ko, E. (2018). Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology*. 16(1): 35 – 43. doi: 10.1016/j.aju.2017.11.001.
101. Wallace, H., Anderson, R & Irvine, S. (2005). Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Oncology* .6: 209-218. doi: 10.1016/S1470-2045(05)70092-9.
102. World Health Organization, WHO *laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, 5° Edit. Switzerland: WHO Press, 2010.
103. Xhou, J., Chen, L., Li, J., Li, H., Hong, Z., Xie, M., Chen, S., & Yao, B. (2015). The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. *PLOS ONE*. 10(7): 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0132974.
104. Yoshida, M., Kawano, N. & Yoshida, K. (2008). Control of sperm motility and fertility: Diverse factors and common mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 3446 – 3457. doi: 10.1007/s00018-008-8230-z.

105. Zebrack, B., Casillas, J., Nohr, L., Adams, H. & Zeltzer, L. (2004). Fertility issues for young adult survivors of childhood cancer. *Psycho-Oncology*. 13: 689-699. doi: 10.1002/pon.784.
106. Zhang, G., Yang, W., Zou, P., Jiang, F., Zeng, Y. Chen, Q., Sun, L., Yang, H., Zhou, N., Wang, X., Liu, J., Cao, J., Zhou, Z. & Ao, L. (2019). Mitochondrial functionality modifies human sperm acrosin activity, acrosome reaction capability and chromatin integrity. *Human Reproduction*. 1-9. doi: 10.1093/humrep/dey335.
107. Zorov, D., Juhaszova, M., & Sollott, S. (2014). *Physiological Reviews*. 94(3): 909 - 950. doi: 10.1152/physrev.00026.2013.
108. Zorova, L., Popkov, V., Plotnikov, E., Silachev, D., Pevzner, I., Jankuaskas, S., Bebenko, V., Zorov, S., Balakireva, A., Juhaszova, M., Scollott, S., & Zorov, D. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*. 552: 50 – 59. doi:10.1016/j.ab.2017.07.009.

I. Apéndices

1. Curvas de titulación

1.1. Vitalidad

1.1.1. Separación por swim-up

Las muestras de semen de humano se obtuvieron por masturbación y se dejaron licuar 30 a 60 minutos en una incubadora a 37°C con atmósfera de 5%. En tubos de ensayo se agregaron primero 400 µl de muestra y se inclinaron 45° respecto a la base en una gradilla. Luego se adicionó lentamente por la pared 1ml del medio celular HTF No Capacitante o medio celular HTF Capacitante (**Tabla 6**), dependiendo el propósito de la muestra. La gradilla se metió en la incubadora a 37°C y con 5 % de CO₂ durante una hora. Al concluir el tiempo se colocaron los tubos en posición vertical y se recuperó la fracción superior de la muestra sin mover el fondo. Se juntó la muestra en tubos distintos para los medios HTF No-Capacitante y HTF-Capacitante. De cada tubo se extrajeron 10 µl para hacer un conteo estimado de la cantidad de espermatozoides por medio del uso de una cámara de conteo “Makler” y un microscopio Nikon Labophot Fluorescente de epifluorescencia con contraste de fase y a un aumento de 10X.

1.1.2. Tinción con Hoechst 33342 e Yoduro de propidio

Con el fin de encontrar la concentración adecuada y mínima necesaria para detectar el cambio en la vitalidad de las células se probaron, dos colorantes que permiten discriminar entre los espermatozoides vivos y muertos: Hoechst 33342 e yoduro de propidio respectivamente.

Se probaron por separado distintas concentraciones de los colorantes sobre la dilución de 1×10^6 espermatozoides por mililitro separados por *swim-up* en medio HTF No

Capacitante. Las concentraciones probadas para Hoechst 33342 fueron: 1, 5, 10, 25 y 50 (ng/ml). Por otro lado, PI se ensayó con 1, 5, 10, y 50 (μM). Ambas curvas de titulación se hicieron con base en trabajos previos realizados en el laboratorio.

1.1.3. Evaluación de la vitalidad por CASA

En las células marcadas con Hoechst 33342 se observó la diferencia clara en la fluorescencia de las células a 25 ng/ml en comparación con las demás concentraciones, por lo que se eligió esta concentración para medir la vitalidad celular al ser evidente el brillo intenso en células vivas y un brillo débil en las muertas. En PI las células se percibieron de forma nítida con 10 μM a diferencia de las demás concentraciones, donde la luminiscencia era tal que se perdía la forma del espermatozoide (**Figura 29**).

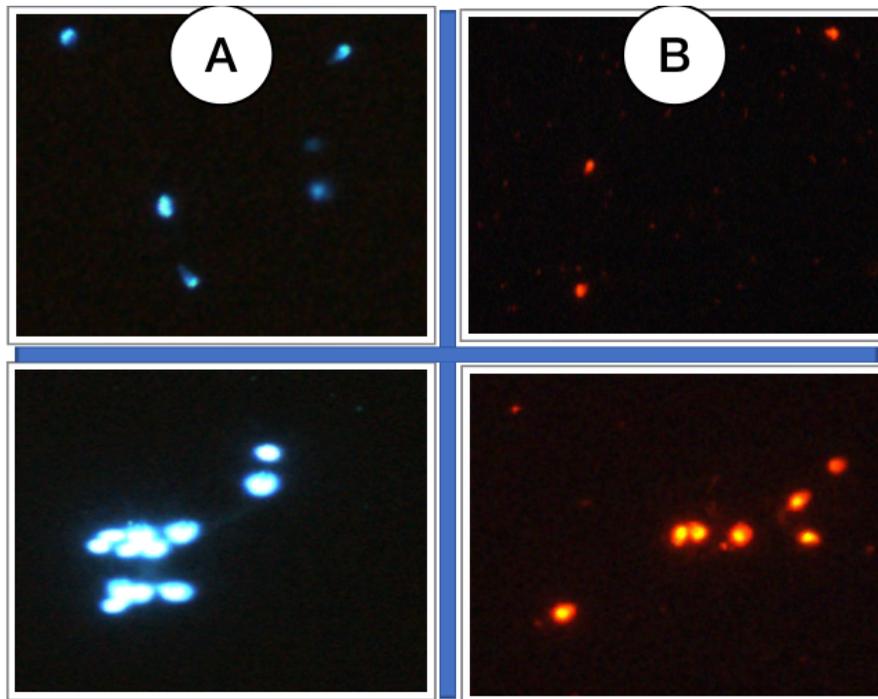


Figura 29. **Comparación entre dos concentraciones diferentes de Hoechst 33342 e yoduro de propidio para observar la vitalidad de los espermatozoides por microscopia.** (A) Hoechst 33342 25ug/ml (arriba) y 1 ug/ml (abajo). (B) PI 10 μM (arriba) y 50 μM (abajo). Se eligió para Hoechst 33342 1ug/ml y para yoduro de propidio 5nM.

1.2. Reacción acrosomal

1.2.1. *Capacitación*

La muestra se procesó por *swim-up* de igual forma que en el apartado 4.1.1.1. Se ajustó la concentración de células a 30×10^6 /ml y se dejaron de 5 a 6 horas en la incubadora a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ en medio capacitado suplementado con bicarbonato y albúmina. Ese es el tiempo que se ha visto previamente en el laboratorio que es suficiente para promover la capacitación de los espermatozoides en estas condiciones.

1.2.2. *Inducción de la reacción acrosomal*

Los espermatozoides se separaron por *swim-up* y se capacitaron como se muestra en la sección 1.1.1. y 1.2.1. respectivamente. Se retiraron los tubos de la incubadora y se repartió la muestra en 300 µl en tubos diferentes. En un tubo se agregaron espermatozoides sin teñir, otro con y sin ionomicina que sirve como inductor de la reacción acrosomal, más un último tubo con espermatozoides muertos teñidos con yoduro de propidio.

1.2.3. *Tinción con FITC-PSA*

Se dejaron incubando durante 30 minutos a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo, se centrifugó durante 5 min a 200 rpm. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de medio celular HTF No-Capacitante. Posteriormente se añadió la concentración de FITC-PSA deseada y se esperó 30 minutos cubriendo las muestras de la luz.

1.2.4 *Interpretación de datos*

Las células de interés se seleccionaron en un *gate* o ventana, que permite resaltar de manera específica la población de células o partículas de interés basado en el tamaño o FSC-A (*forward scatter* – Área o dispersión frontal - Área) y la complejidad celular o SSC-A (*side*

scatter – Área o dispersión lateral- Área), para excluir partículas contaminantes mediante la creación de un “gate” o ventana. (**Figura 30-A**). Se realizó el segundo filtro y se purgó la población de dobletes o agregados que pasaron al mismo tiempo por el láser. Para ello se graficó FSC-A contra FSC-H (*forward scatter – height* o dispersión frontal – Altura) (**Figura 30-B**). Esto permite visualizar las células localizadas por debajo de la recta gracias a que los dobletes tienen el mismo FSC-H pero el doble FSC-A, y analizar únicamente las células localizadas sobre la recta.

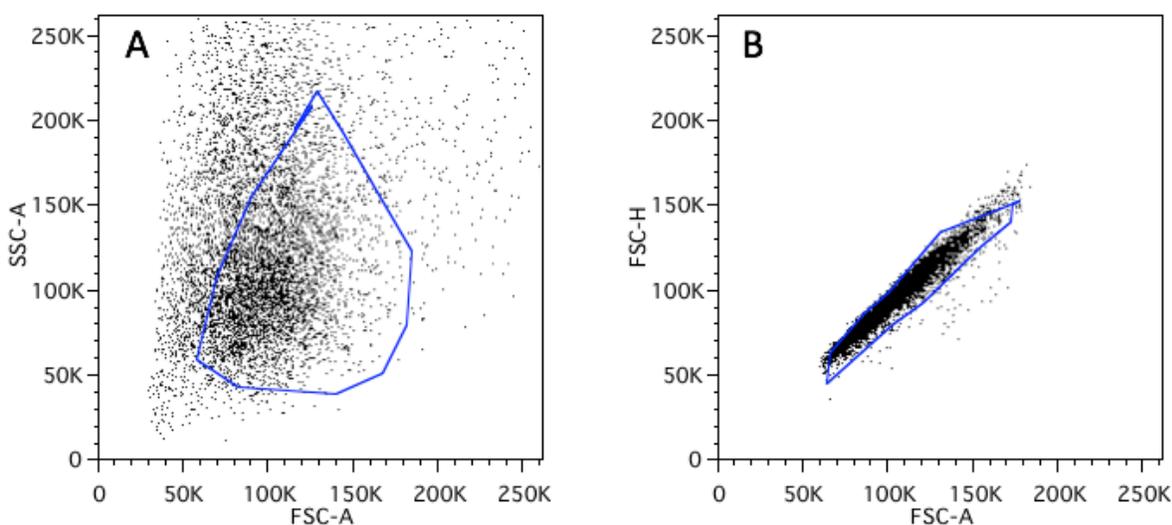


Figura 30. **Experimento representativo de la interpretación de los resultados, previa al análisis de fluorescencia.** Trazo azul representa el *gate* o ventana creado para extraer la población celular de interés.

1.2.5. Evaluación del estado del acrosoma

Se probó en el primer ensayo el colorante FITC-PSA con las siguientes concentraciones: 2.5, 1 y 0.5 ($\mu\text{g/ml}$). Además, se dispuso de otra curva de titulación para yoduro de propidio: 500, 250, 100, 50 y 25 (nM), con el fin de identificar la concentración mínima y apta para reconocer entre las células vivas de las muertas. Ambas curvas de titulación se hicieron con base en trabajos previos realizados en el laboratorio.

Como resultado de este primer ensayo se encontró para FITC-PSA (**Figura 31**) que 2.5 $\mu\text{g/ml}$ emitía alejado del trazo control (células sin teñir), y, por tanto, daba lugar a un

margen de error. Ambas concentraciones de 1 y 0.5 ($\mu\text{g/ml}$) parecían certeras, sin embargo, se decidió repetir el experimento con concentraciones por debajo a estas concentraciones.

Para PI (**Figura 32**) se encontró que 50 nM era la dosis correcta que permitía distinguir claramente y sin margen de error entre las células vivas y muertas, al generar el trazo más cercano al control (células sin teñir).

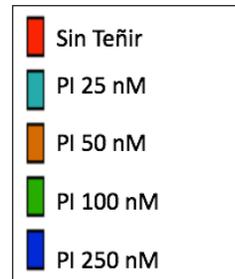
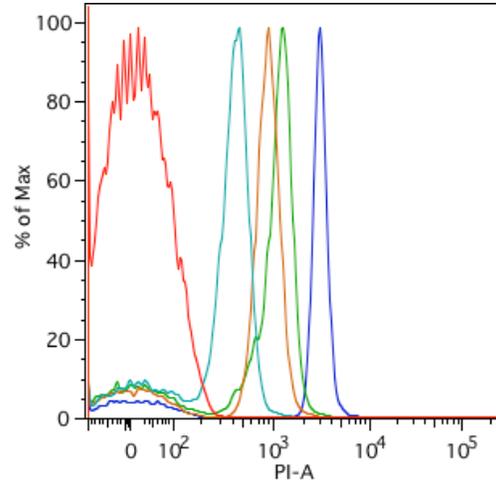
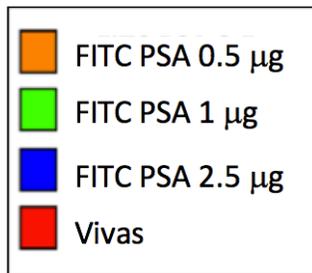
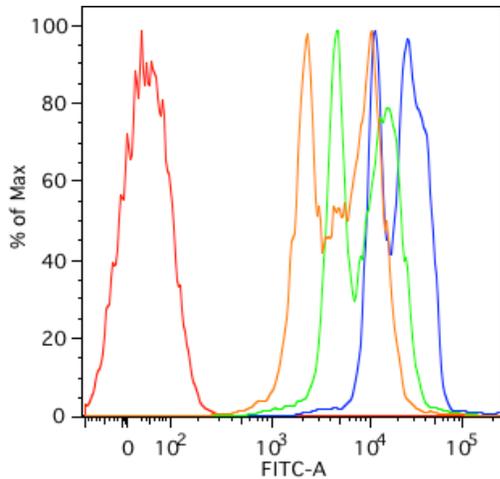


Figura 31. Experimento representativo de medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos teñidos con diferente concentración de FITC PSA.

Histograma del porcentaje normalizado de células (% Max) contra la fluorescencia de FITC-A en espermatozoides capacitados e inducidos con A23187 ($10\mu\text{M}$) teñidos con distintas concentraciones de FITC-PSA. El trazo rojo corresponde a células vivas sin teñir que sirvió como control. Trazo azul corresponde a células vivas teñidas con 2.5 μg de FITC PSA. Trazo verde corresponde a células vivas teñidas con 1 μg de FITC PSA. Trazo naranja corresponde a células vivas teñidas con 0.5 μg de FITC PSA. Se observa el desplazamiento progresivo a la derecha conforme aumenta la concentración del colorante.

Figura 32. Experimento representativo de medición por citometría de flujo de la vitalidad de espermatozoides teñidos con PI.

Histograma del porcentaje normalizado de células (% Max) contra la fluorescencia de PI-A en espermatozoides muertos por calor teñidos con distintas concentraciones de PI. El trazo rojo corresponde a células muertas sin teñir que como control. Trazo azul claro corresponde a células muertas teñidas con 25 nM de PI. Trazo verde corresponde a células muertas teñidas con 100 nM de PI. Trazo azul fuerte corresponde a células muertas teñidas con 250 nM de PI. Trazo naranja corresponde a 50nM de PI y se observa inmediatamente después del trazo control.

En el segundo ensayo para la curva de FITC-PSA (**Figura 33**) se utilizó las concentraciones: 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 y 0.025 ($\mu\text{g/ml}$). Además, se combinó con PI (50 nM) para discernir entre las células muertas reaccionadas. Se encontró que 1 $\mu\text{g/ml}$ concentraba un mayor porcentaje de espermatozoides positivos en la fluorescencia de FITC-PSA que las demás concentraciones favoreciendo está concentración como la adecuada para la medición de este parámetro en espermatozoides (**Figura 34**).

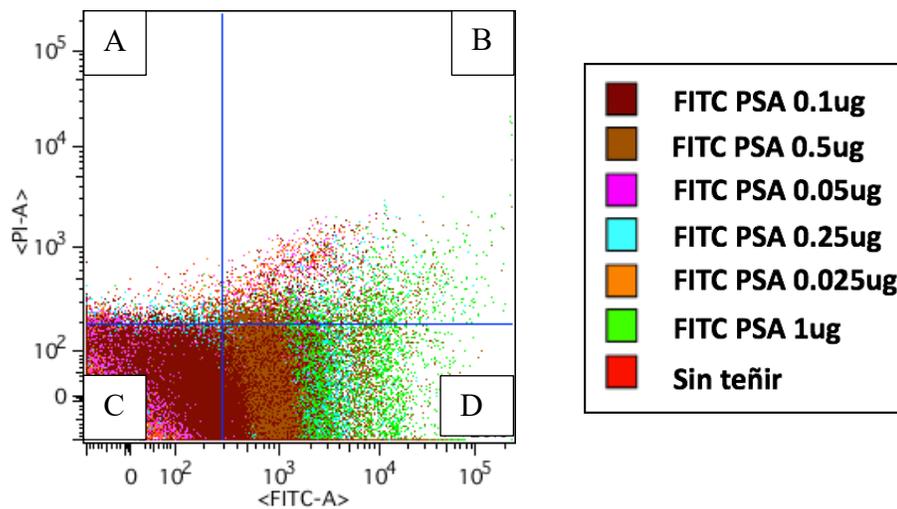


Figura 33. Gráfica de puntos de la medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos con A23187 y teñidos con distintas concentraciones de FITC PSA. Se muestran cuatro cuadrantes: A) superior izquierdo (células muertas, positivas para PI), B) superior derecho (células positivas para FITC-PSA y PI), C) inferior izquierdo (células sin teñir) y D) el inferior derecho (células vivas positivas para FITC-PSA). Se observa que a bajas concentraciones de colorante la población de células se localiza en el cuadrante inferior izquierdo. Puntos rojos corresponden a células vivas sin teñir. Puntos verdes corresponde a células vivas teñidas con 1 μg de FITC PSA. Puntos naranjas corresponde a células teñidas con 0.025 μg de FITC PSA. Puntos azules corresponden a células teñidas con 0.25 μg de FITC PSA. Puntos magenta corresponden a células teñidas con 0.05 μg de FITC PSA. Puntos marrones corresponden a células teñidas con 0.5 μg de FITC PSA. Puntos marrones oscuro corresponden a células vivas teñidas con 0.1 μg de FITC PSA.

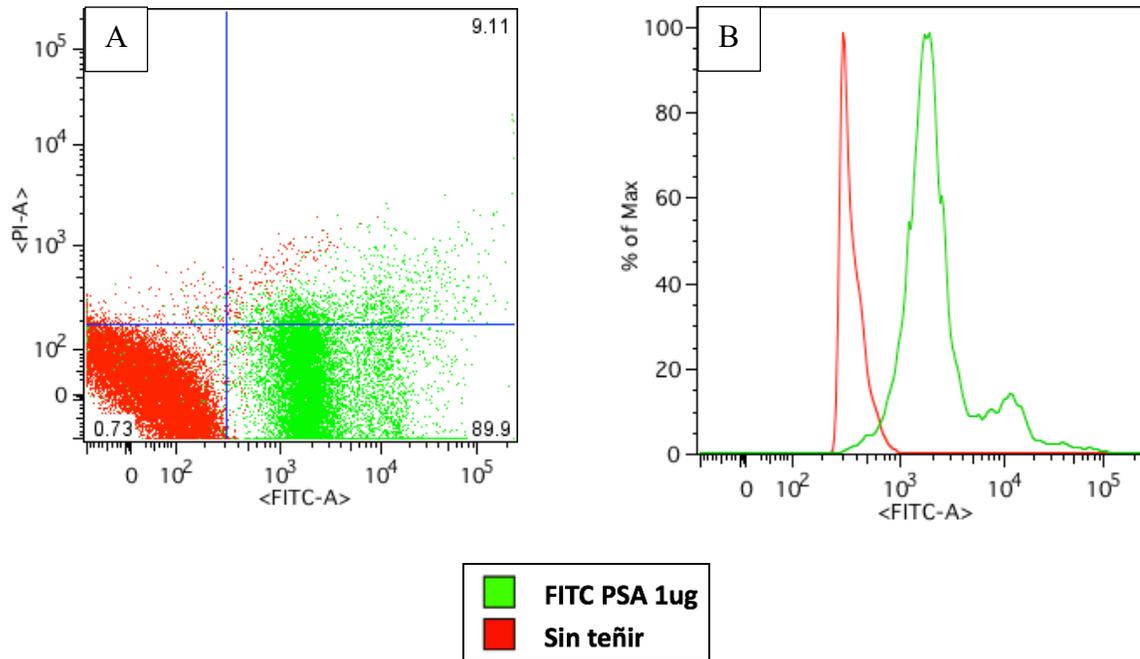


Figura 34. **Experimento representativo de medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos con A23187 y teñidos 1 μ g de FITC PSA.** A) Gráfica de puntos de la medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos con A23187 (10 μ M) teñidos con 1 μ g de FITC PSA y células sin teñir en rojo. Se muestran cuatro cuadrantes: superior izquierdo (células muertas, positivas para PI), superior derecho (células positivas para FITC-PSA y PI), inferior izquierdo (células sin teñir) y el inferior derecho (células vivas positivas para FITC-PSA). Se observa que casi el 90% de la población de células se localiza en el cuadrante inferior derecho. B) Histograma del porcentaje normalizado de células (% Max) contra la fluorescencia de FITC-A en espermatozoides capacitados e inducidos con A23187 (10 μ M) teñidos con 1 μ g de FITC-PSA positivos para FITC-PSA y negativos para PI localizados en el cuadrante inferior derecho.

Como último ensayo se probó 1 μ g/ml de FITC-PSA en combinación con 50 nM de yoduro de propidio usando distintos inductores de la reacción acrosomal, puntualmente progesterona (4 μ M) e ionomicina (10 μ M). Como se ha reportado, espermatozoides tratados con ionóforos de Ca^{2+} , ya sea ionomicina o A23187, provocan la RA de forma rápida y en mayor cantidad de células (Harper *et al.*, 2006; Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2014), en comparación a la progesterona. Se encontró que la ionomicina es el inductor idóneo al permitir la clara distinción entre las células reaccionadas de las no reaccionadas (Figura 35).

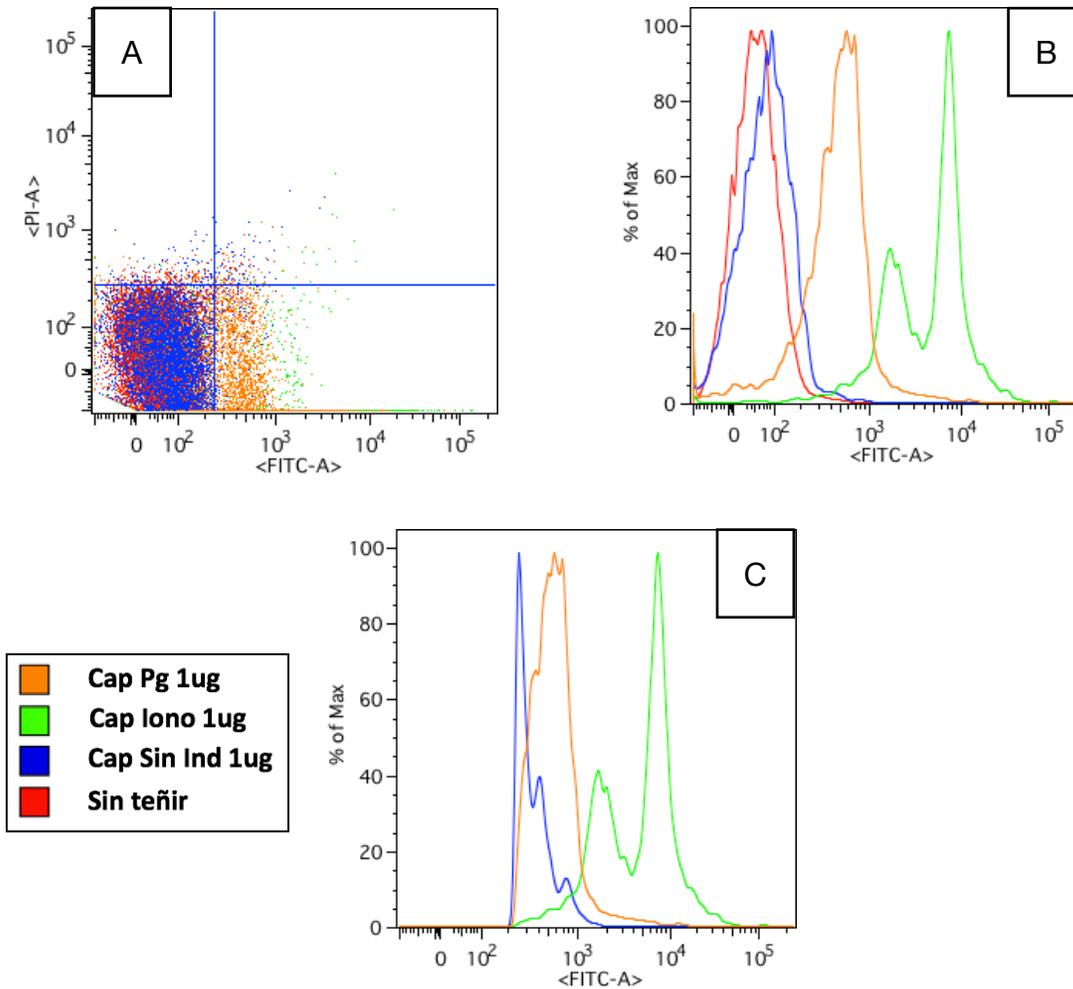


Figura 35. **Experimento representativo de medición por citometría de flujo de la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados e inducidos con progesterona e ionomicina teñidos con 1µg de FITC-PSA.** A) Gráfica de puntos donde se muestran cuatro cuadrantes: superior izquierdo (células muertas, positivas para PI), superior derecho (células positivas para FITC-PSA y PI), inferior izquierdo (células sin teñir) y el inferior derecho (células vivas positivas para FITC-PSA). B) Histograma del porcentaje normalizado de células (% Max) contra la fluorescencia de FITC-A del total de células en los cuatro cuadrantes. C) Histograma del porcentaje normalizado de células (% Max) contra la fluorescencia de FITC-A de las células en el cuadrante inferior derecho. Se observa que una clara distinción entre las células sin inducir (azul) y las células con ionomicina (verde), además de dos picos de distinta fluorescencia que representan a las células no reaccionadas (pico de menor fluorescencia) y a las células reaccionadas (pico de mayor fluorescencia). Trazo y puntos rojos corresponden a células vivas sin teñir. Trazo y puntos azules corresponden a células vivas capacitadas sin inducir teñidas con 1 µg de FITC PSA. Trazo y puntos verdes corresponden a células vivas capacitadas e inducidas con ionomicina (10 µM) y teñidas con 1 µg de FITC PSA. Trazo y puntos naranjas corresponden a células vivas capacitadas e inducidas con progesterona (4 µM) y teñidas con 1 µg de FITC PSA.

1.3. Potencial de membrana mitocondrial

1.3.1. *Tinción con JC-1*

Los espermatozoides se separaron por *swim-up* como se muestra en la sección 4.1.1.1. Se retiraron los tubos de la incubadora y se hicieron alícuotas de 300 μl en tubos diferentes. Se probaron las siguientes condiciones experimentales: 1) espermatozoides sin teñir, 2) 0.5 μM de BCECF, 3) espermatozoides muertos teñidos con yoduro de propidio y 4) otro para teñir con JC-1.

La muestra para la condición 4) se teñó con la concentración deseada de JC-1 y después se dejó incubar 30 minutos a 37°C y a una atmósfera 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo se centrifugó durante 5 minutos a 2400 rpm y se retiró el sobrenadante. Por último, se resuspendió en 1 ml de medio celular HTF No-Capacitante.

1.3.2. *Evaluación del potencial de membrana mitocondrial*

La interpretación de los datos recabados por el citómetro se realizó de la misma forma que en el apartado 3.5.4.2. Para medir el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides se evaluó el colorante JC-1 en los rangos de concentraciones: 1, 2, 3, 4 y 5 (μM). Se eligió esta curva con base en trabajos reportados donde utilizan concentraciones cercanas (Troiano *et al*, 1998; Kotwicka *et al*, 2016;). Dicho colorante emite en dos longitudes de onda, verde (registrada con el filtro para FITC-A 520nm) y rojo (registrada con PI 596nm) acorde al estado del potencial de óxido reducción en la mitocondria. Se encontró que 3 μM es la dosis adecuada y mínima necesaria para visualizar cambios en ambas fluorescencias (**Figura 36**).

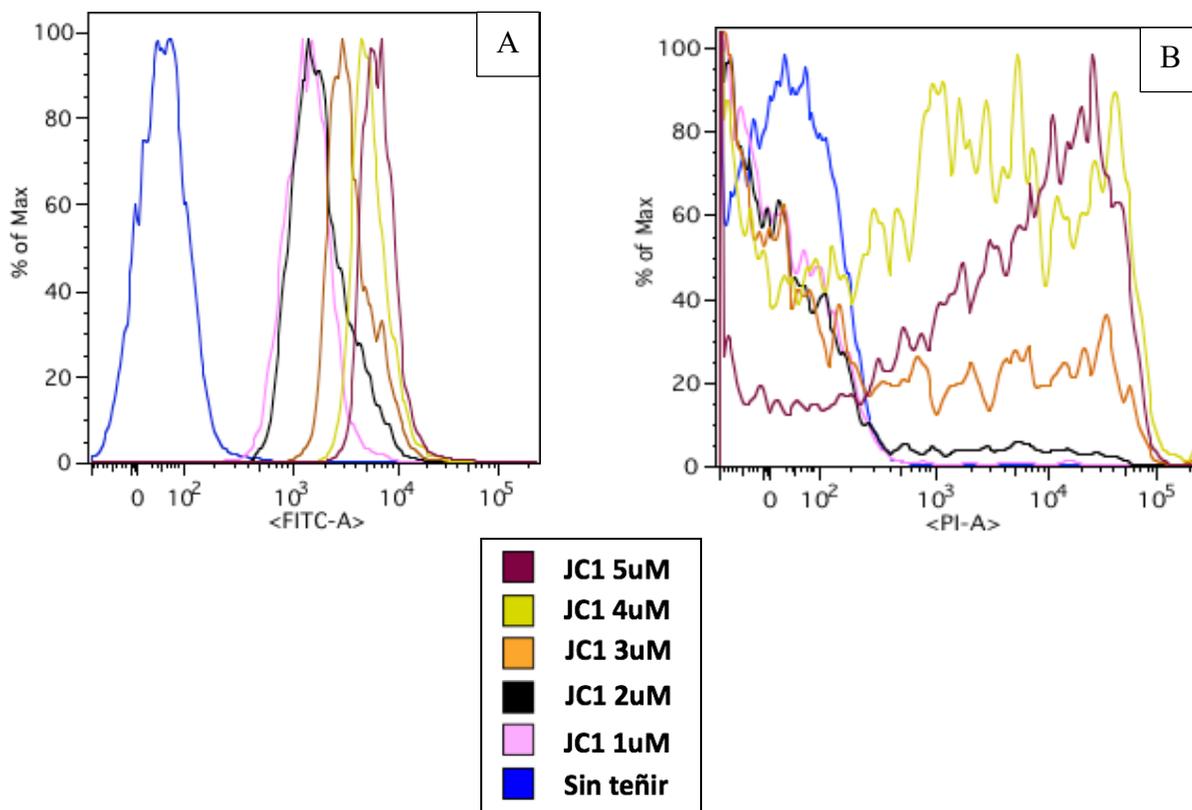


Figura 36. **Experimento representativo de medición por citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides teñidos con JC-1.** Histogramas del porcentaje normalizado de células (% Max) contra la fluorescencia en FITC (A) y PI (B). Trazo azul corresponde a células sin teñir. Trazo rosa corresponde a células teñidas con 1 μM de JC-1. Trazo negro corresponde a células teñidas con 2 μM de JC-1. Trazo naranja corresponde a células teñidas con 3 μM . Trazo amarillo corresponde a células teñidas con 4 μM de JC-1. Trazo morado corresponde a células teñidas con 4 μM . A) Espermatozoides teñidos con distintas concentraciones de JC-1. Se puede observar que el trazo 3 μM de JC-1 (naranja) se encuentra lo suficientemente lejos del trazo azul, permitiendo discernir un aumento o disminución de la fluorescencia. B) El trazo naranja muestra un bajo número de células normalizadas a diferencia de los demás trazos permitiendo así distinguir cambios en la fluorescencia.

Para comprobar que 3 μM de JC-1 en efecto, permite observar cambios en el potencial de membrana mitocondrial, se utilizó cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidracona (CCCP), desacomplante conocido de la mitocondria que disminuye el potencial de membrana (Zhang *et al.*, 2018), y nicotinamida, precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) quien se ha reportado tiene la capacidad de aumentar el potencial (Song *et al.*, 2017). Aunque en el

ensayo realizado la nicotinamida no aumentó el potencial como se esperaba, y en su lugar lo disminuyó, se pudo detectar el cambio con ambos compuestos (**Figura 37**).

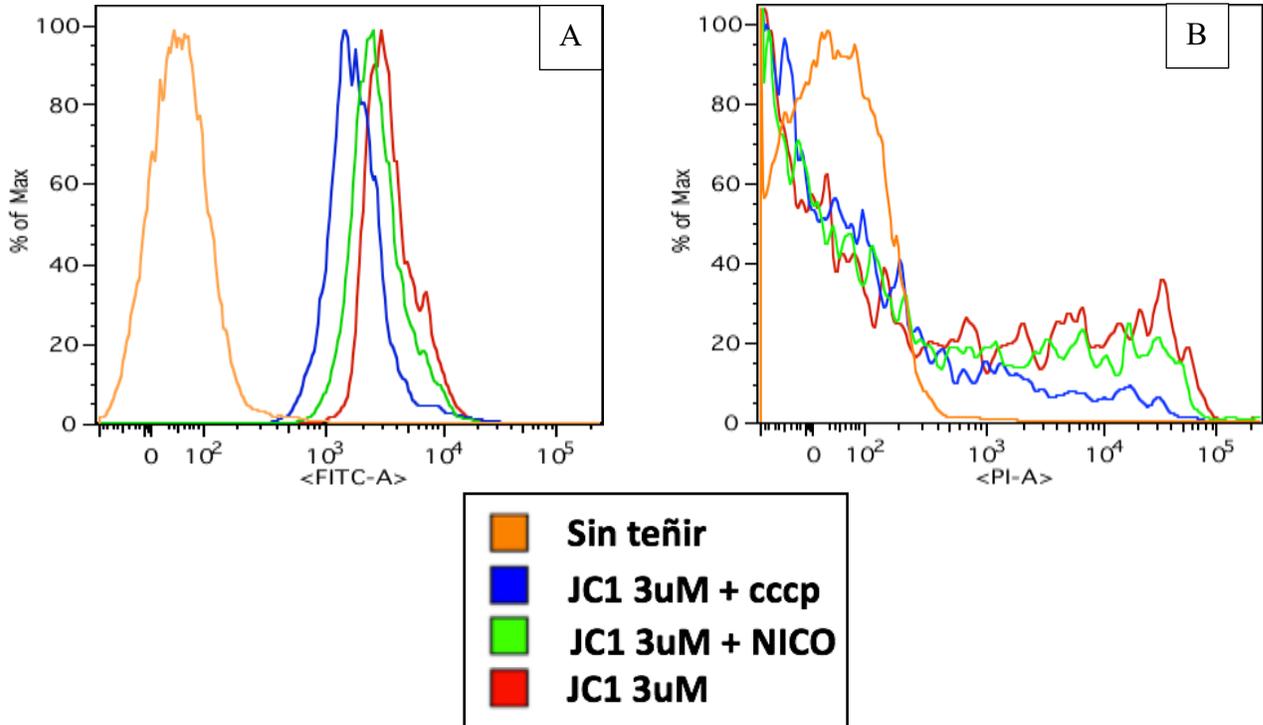


Figura 37. Experimento representativo de medición por citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides teñidos con JC-1, CCCP y nicotinamida como controles negativos y positivos respectivamente. Histograma del porcentaje normalizado de células (% Max) contra la fluorescencia en FITC-A (A) y PI (A) en espermatozoides teñidos con 3uM de JC-1, CCCP y nicotinamida. Trazo naranja corresponde a células sin teñir. Trazo rojo corresponde a la fluorescencia registrada con 3 μ M. Trazo azul corresponde a células teñidas con 3 μ M de JC-1 más CCCP. Trazo verde corresponde a células teñidas con 3 μ M de JC-1 y nicotinamida. Se observa ante esta concentración se puede distinguir claramente cambio en el potencial de membrana por CCCP o nicotinamida sin invadir sobre el trazo control.

2. Apéndice de tablas

Tabla 4. Reactivos utilizados para el ensayo de vitalidad

| Reactivo | Fundamento | Función |
|--------------------|--|--|
| Hoechst 33342 | Molécula permeable a la célula a fin al DNA, puntualmente a bases adenina y timina. Se excita a 350nm y emite a 460nm. | Fluoróforo utilizada para medir la viabilidad celular. Permite distinguir entre células vivas y muertas al teñir a las células vivas |
| Yoduro de propidio | Molécula pequeña que se une a ADN pero no ingresa pasivamente en espermatozoides que poseen una membrana completa. Marcador de unión no covalente. Se excita a 488 nm y emite a 617nm. | Permite discriminar entre células muertas. |

Tabla 5. Reactivos para ensayo de reacción acrosomal en citometría

| Reactivo | Fundamento | Función |
|----------|---|--|
| FITC-PSA | Fluoróforo conjugado a la lectina de <i>Pisum sativum</i> (PSA). Se une a glicoconjugados en el acrosoma y tiñe la matriz acrosomal. Se excita a 488 nm y emite a 560 nm. | Permite identificar que espermatozoides han sufrido reacción acrosomal. La ausencia de marcaje indica que ocurrió reacción acrosomal |
| Ionicina | Ionóforo de cationes divalentes que permite la entrada de Ca^{2+} los cuales desencadenan la RA. | Permite la inducción química de la RA. |

Tabla 6. Reactivos para ensayo de potencial de membrana mitocondrial

| Reactivo | Fundamento | Función |
|----------|---|---|
| JC-1 | <p>Colorante con estructura con carga positiva y lipofílica que le permite ingresar fácilmente a las células y mitocondrias.</p> <p>La carga negativa de la membrana mitocondrial interna produce la agregación del colorante donde forma dímeros que emiten fluorescencia de color rojo (625-740nm) cuando existe alto potencial mitocondrial. En cambio, cuando disminuye el potencial mitocondrial emite color verde (520-565nm)</p> | Permite saber que espermatozoides tienen mayor o menor potencial de membrana mitocondrial |
| CCCP | Protonóforo inhibidor de la fosforilación oxidativa | Desacoplante de la mitocondria. Aumenta el potencial de membrana mitocondrial |

Tabla 7. Medios utilizados

| Reactivo | Composición (mM) | Propiedades y función |
|--------------------------|--|--|
| Medio HTF No Capacitante | <p>NaCl⁻ 99.69 KCl⁻ 4.67 CaCl₂ (1.6) Piruvato 3.38 MgSO₄ 1.2 Glucosa 2.78 HEPES 23.8 Lactato de sodio 60 KH₂PO₄ 0.314 pH: 7.4</p> | Medio empleado para lavado de espermatozoides. |
| Medio HTF Capacitante | <p>Medio HTF suplementado con NaHCO₂ 2 mg/mL Albúmina de suero bovino (BSA) 5 mg/ml</p> | Medio HTF que promueve la capacitación de los espermatozoides. |

3. Imágenes suplementarias

3.1. Controles para reacción acrosomal.

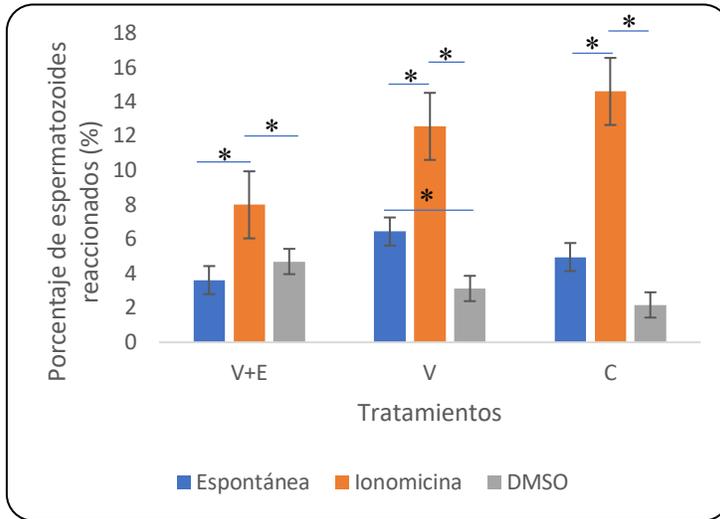


Figura 38. **Porcentaje de reacción acrosomal espontánea inducida por ionomicina en espermatozoides después de la criopreservación.** El porcentaje de espermatozoides reaccionados en el tratamiento con ionomicina fue superior en todos los tratamientos y significativo en comparación al porcentaje de reacción acrosomal espontánea y con DMSO. El control negativo de DMSO no fue estadísticamente significativo con el porcentaje de reacción espontánea para la vitrificación en presencia de antioxidante y congelación lenta, pero si fue significativo en la vitrificación sola. El análisis se hizo en citometría (n = 13). Se realizó un ANOVA de una vía para cada tratamiento con sus respectivos controles. Estos reportaron lo siguiente: V+E p <0.011, V y C p <0.001.

3.1.2 Control de CCCP para potencial de membrana mitocondrial.

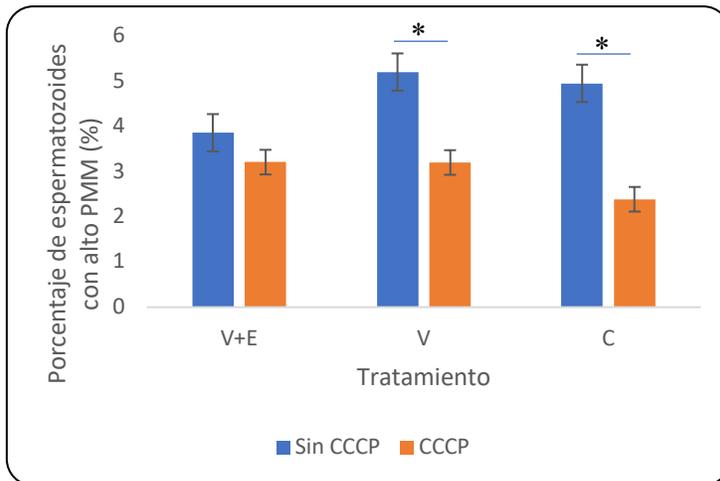


Figura 39. **Disminución del PMM en espermatozoides después de la criopreservación ante la adición de CCCP.** El PMM disminuyó de forma significativa ante la adición del desacoplante de la mitocondria CCCP en los tratamientos V y C. A diferencia del tratamiento V+E donde no hubo diferencia significativa. El análisis se hizo en citometría (n = 13). El análisis se hizo en Citometría (n = 13) Se realizó una prueba *T-student* para cada tratamiento y se obtuvo lo siguiente: V+E p = 0.1458, V y C p < 0.001.