



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática en ratón

Alumna: Candelaria Ponce de León Collado

Junio, 2014

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1. Especies reactivas del oxígeno	4
3.1.1. <i>ERO y actividad espermática</i>	5
3.1.2. <i>Factores de producción de ERO</i>	7
3.2. Sistema antioxidante	7
3.3. Criopreservación	9
3.4. Reproducción asistida	9
3.5. Citometría de flujo	11
3.6. Antecedentes	12
3.6.1. <i>Estudios previos</i>	12
3.7. Justificación y objetivos	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Obtención de material y muestras	15
4.2. Diseño experimental	16
4.2.1. <i>Análisis macroscópico y microscópico</i>	17
4.2.1.1. <i>Movilidad</i>	17
4.2.1.2. <i>Vitalidad</i>	17
4.2.1.3. <i>Morfología</i>	18
4.2.2. <i>Tratamiento con fluorocromos y análisis por citometría</i>	18
4.2.2.1. <i>Evaluación del estado de la membrana lipídica</i>	19
4.2.2.2. <i>Producción de ERO</i>	19
4.2.2.3. <i>Determinación de la condensación de la cromatina</i>	19
5. RESULTADOS	20

5.1. Análisis experimental 1	20
5.2. Análisis experimental 2	24
6. DISCUSIÓN	32
7. BIBLIOGRAFÍA	35

1. RESUMEN

El estrés oxidativo provoca un daño celular en el espermatozoide, causando peroxidación de lípidos de membrana y la fragmentación del ADN con una consecuente pérdida de fertilidad. La conservación seminal para su uso posterior representa la técnica de criopreservación, para la cual es de vital importancia conocer las condiciones de estrés oxidativo que sufren los espermatozoides cuando son manipulados y ayudar en la preservación del semen mediante la adicción de antioxidantes. En este estudio, se analizó el espermatozoide fresco y criopreservado de ratón, mediante (i) un análisis macroscópico y microscópico (ii) análisis estructural y funcional mediante el uso de citometría de flujo y fluorescencia. Como resultado se evidenciaron los efectos de los cambios de temperatura y pH en la integridad del espermatozoide y como responde positivamente ante una adicción externa de GSH, mejorando la estabilidad del espermatozoide, por lo que el efecto de la criopreservación sobre los espermatozoides está evidenciado y requiere un mayor estudio que permita un mejor aprovechamiento del material para su uso posterior sin que los espermatozoides sufran daños que condicione su capacidad fecundante.

Palabras clave: Infertilidad masculina, estrés oxidativo, antioxidantes, espermatozoides, criopreservación, conservación espermática.

2. ABSTRACT

Oxidative stress produce cell damage in the sperm, causing lipid peroxidation in the membrane and DNA fragmentation with the consequent lost of fertility. The seminal conservation for a later application represents the cryopreservation technique, for what it's of vital importance to know the conditions of oxidative stress that suffers the sperm when it is manipulated and help in the seminal preservation with the addition of antioxidants. In this study: (i) a macroscopic and microscopic analysis, (ii) a structural and functional analysis with the use of flow cytometry and fluorescence, the fresh and cryopreserved mouse semen was analyzed. The results showed that there were effects on changes in temperature and pH in the integrity of the sperm and how it responds positively in the presence of exogenous addition of antioxidant (GSH), improving the stability of sperm, so, the effect of cryopreservation on the sperm is evidenced and requires further study to allow a better use of the

material for a later use without sperm damage that condition its capacity of fertilization.

Keywords: Male infertility, oxidative stress, antioxidant, spermatozoa, cryopreservation, sperm conservation.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Especies reactivas del oxígeno

El proceso bioquímico de la oxidación consiste en una pérdida de electrones, asociada a otro de captación denominada reducción. Esta oxidación es importante para la vida, pues participa en los procesos de obtención de la energía celular. Sin embargo, cuando éste proceso existe en exceso aparece el fenómeno denominado como estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un desequilibrio en entre las especies reactivas del oxígeno (ERO) y los antioxidantes, pudiendo derivar en un daño celular. Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón desapareado en su último nivel y se comportan como moléculas altamente reactivas, pudiendo causar un daño por reaccionar con diversas biomoléculas, sustrayéndoles electrones para lograr su estabilidad (Mallok *et al*, 2011). Las especies reactivas del oxígeno se producen continuamente en el organismo, durante el metabolismo celular normal y en algunas ocasiones en respuesta a la exposición a factores exógenos (Villar y Guzmán, 1996), (Baumber *et al*, 2003) y (Wang y Mahaney, 2001).

Aún así los radicales libres también poseen importantes funciones fisiológicas en el organismo, participando en la fagocitosis, favoreciendo la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la membrana y favorecen la Quimiotaxis (Hicks *et al*,2006) y (Venereo,2002), indicando así que los radicales libres se deben de considerar beneficiosos o tóxicos dependiendo de la concentración y de los mecanismos antioxidantes (Chihuailaf *et al*,2002).

El estrés oxidativo, al cual siempre las células vivas están expuestas en condiciones normales, refleja un relativo balance entre las especies reactivas del oxígeno generadas y removidas, por eso, una alteración de los mecanismos

antioxidantes puede desembocar en un daño celular que puede llegar a modificar la estructura de algunas moléculas biológicas dependiendo del contenido de compuestos orgánicos. El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre a nivel de lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos (Venereo, 2002):

Lípidos: El daño producido a este nivel se denomina peroxidación lipídica y afecta a la membrana celular que es rica los ácidos grasos poliinsaturados produciéndose la apoptosis celular (Jerlik *et al*, 2000). Las membranas celulares son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno (Cadenas, 1997) y (Reylli y Burkley, 1990). Los factores que más influyen en la preoxidación lipídica son la naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente peroxidante, del contenido de ácidos poliinsaturados, su accesibilidad y la activación de encimas que inhiben el proceso como es la glutatión peroxidasa entre otros (Venereo, 2002).

Proteínas: Se oxidan grupos de aminoácidos, se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y por último hay formación de grupos carbonilos (Cárdenas y Pedraza, 2006).

Ácido desoxirribonucleico: Acontecen mutaciones, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones que alteran la correcta expresión de la información y funcionamiento de la célula (Cárdenas y Pedraza, 2006).

Carbohidratos: La glucosa y otros monosacáridos sufren peroxidación y estas biomoléculas una vez activadas pueden interactuar con otras y conformar nuevas asociaciones moleculares (Blokhina *et al*, 2003).

3.1.1. ERO y actividad espermática

En el semen existen fundamentalmente dos fuentes generadoras de ERO: los espermatozoides y los leucocitos presentes en el líquido espermático (Hernández *et al*, 2010).

Los espermatozoides producen ERO por medio de las mitocondrias y son el producto de la reducción del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa (Kirchhoff, 1998). Los fosfolípidos realizan una fundamental función en la fertilidad,

ya que bajas proporciones de éste están relacionadas con reducción de concentraciones de espermatozoides (Rooke *et al*, 2001).

La actividad anormal de los espermatozoides interviene en la liberación de especies reactivas del oxígeno, contribuyendo activamente en la infertilidad, peroxidando los ácidos grasos poliinsaturados esterificados a fosfolípidos de membrana, lo cual produce una permeabilización de la membrana plasmática y acrosomal generando poros de membrana conduciendo a una pérdida en la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante del espermatozoide y produciendo a su vez, un bloqueo en la biosíntesis de ATP (Castillo *et al* ,2001) y (Álvarez,2006), es decir, se reduce el aporte energético de la célula.

Se sabe que el proceso de maduración de los espermatozoides ocurre en el epidídimo y que es muy importante para los cambios estructurales y funcionales que sufre la célula espermática por lo que alteraciones a ese nivel causa un desequilibrio antioxidante en pos de la oxidación del espermatozoide.

El estrés oxidativo interviene en el daño acrosomal durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo dañando el acrosoma e inhibiendo la inducción de la reacción acrosomal (Álvarez, 2006). Además, los espermatozoides sufren un daño en el ADN producido después de la migración de espermatozoides inmaduros desde los túbulos seminíferos al epidídimo ya que producen elevados niveles de ERO, produciendo la fragmentación directa o indirecta del ADN al nivel del epidídimo (Aitken y Krausz , 2001).

A sido demostrado que la activación de los leucocitos es un paso importante para que ellos produzcan citoquinas y ERO (Arata *et al*, 2005). El grado de daño espermático inducido por las ERO depende de la localización de la reacción inflamatoria, la duración de la exposición del espermatozoide a éstos y de la capacidad del espermatozoide para activar el sistema de defensa inmunológica (Everaert, 2003). En 1992 la Organización Mundial de la Salud estableció que mas de 1×10^6 leucocitos/ml de semen debe considerarse anormal (World Health Organization Laboratory, 1992). Además se ha reportado que la generación de ERO es 1,000 veces mayor en leucocitos que en espermatozoides durante la capacitación

(Plante *et al*, 1994) pudiendo esto indicar que los leucocitos son los principales productores de ERO en el semen.

3.1.2 Factores de producción de ERO

Los efectos de las ERO dependen de su concentración y naturaleza, siendo imprescindibles para el proceso de capacitación de los espermatozoides y para el mecanismo de defensa en una infección en concentraciones moderadas para el organismo (Aitken y Baker, 1995), pero, un desequilibrio puede causar procesos de daño celular a nivel de membrana y ADN, desencadenando alteraciones que afectan directamente a la viabilidad, motilidad y a capacidad fecundante del espermatozoide.

Las ERO afectan directamente a la integridad del ADN espermático, siendo de gran importancia éstas para la formación de los gametos y la capacidad fecundante (Tremellen, 2008). Los daños que causa son a nivel de la condensación de la cromatina debido a una oxidación elevada de determinadas proteínas. El ADN, en condiciones normales se encuentra empaquetado y protegido a través de unas proteínas denominadas protaminas, siendo deficitarias en el caso de padecer infertilidad (Villegas, 2005).

Se sabe que la congelación induce una significativa disminución en el sistema antioxidante y aumenta los niveles de ERO que se presente después de la criopreservación (Gadea *et al*, 2013). Además, durante la criopreservación los espermatozoides están sujetos a un estrés tanto físico como químico resultando en cambios a nivel de la membrana plasmática, motilidad viabilidad y estado del acrosoma(O'Connell *et al*, 2002) .Se piensa que los daños criogénicos sobre los espermatozoides se deben a múltiples factores como puede ser el daño de la estructura o función durante la congelación o un aumento de la presión osmótica entre otros (Brotherton, 1990).

3.2. Sistema antioxidante

La acción del antioxidante es evitar alteraciones de moléculas biológicas funcionalmente vitales o más importantes con el objetivo de mantener el equilibrio oxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los espermatozoides portan sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de las ERO, por lo que los

antioxidantes poseen la función de actuar como donadores de electrones evitando la cadena de óxido-reducción (Hicks *et al*, 2006) o sacrifica su integridad molecular para evitar alteraciones importantes a nivel lipídico, proteico, ADN... (Venereo, 2002), previniendo la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones (Membrillo *et al*, 2003). Tienen la capacidad de impedir que otras moléculas se unan al oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres que estos con las moléculas presentes.

Una de las enzimas intracelulares antioxidantes más importantes que tenemos en nuestras células, incluso en el plasma seminal, es la glutatión peroxidasa que desempeña un papel importante en el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo intracelular. Glutatión peroxidasa utiliza GSH para reducir el peróxido de hidrogeno en agua y lipoperóxidos a alcoholes de alquilo y el glutatión oxidado resultante se reduce a GSH por la glutatión reductasa usando NADPH como co-factor (Gadea *et al*, 2010).

El contenido de GSH presente en diferentes espermatozoides expuesto a una reducción puede causar muchos problemas funcionales y morfológicos en los mismos, afectando la capacidad de unirse al ovulo. Si se eleva los niveles de Glutatión se tendrá mejor estado de los espermatozoides en cuanto a la calidad y cantidad presentes en el líquido seminal. Los niveles de Glutatión y fertilidad masculina son directamente proporcionales.

Por otra parte, los antioxidantes exógenos actúan como moléculas que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen.

Existen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos; los sistemas enzimáticos metabolizan los radicales libres generados en los procesos metabólicos y los no enzimáticos destruyen directamente los radicales libres generados. Por último existe un tercer grupo de antioxidantes conocidos como los antioxidantes terciarios que reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres del oxígeno (Córdova *et al*, 2009).El glutatión es un antioxidante que protege a las células de toxinas tales como los radicales libres.

3.3. Criopreservación

Esta técnica se utiliza, en el caso que nos atañe, en situaciones en las que se desea conservar los espermatozoides para su posterior uso o debido a que el paciente sufra algún tipo de alteración que puedan dañar sus células germinales o una especie concreta sufra un riesgo que atente contra su supervivencia o fertilidad. La criopreservación está basada en el proceso de congelación rápida de células, tejidos u organismos mediante nitrógeno líquido con la intención de conservar la viabilidad de los especímenes. Para lograr que sea eficaz el proceso se apoya en la utilización de soluciones diluyentes que protegen del daño producido por la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación-descongelación. Que estos diluyentes realicen eficientemente su labor de cara a la criopreservación depende de diferentes factores, como la permeabilidad de la membrana o la concentración del diluyente, ya que dependiendo de la especie se requieren diferentes concentraciones de cada crioprotector y diferentes tiempos de permanencia en la solución crioprotectora (Rana ,1995) por lo que cada especie responde de distinta manera a estos crioprotectores, originando diferentes efectos sobre los organismos al aplicar las mismas metodologías(Renard y Cochard, 1989).

Durante el proceso de criopreservación existen dos procesos importantes que afectan a la integridad del espermatozoide: la producción de ROS que pueden inducir cambios en el funcionamiento de la membrana de los espermatozoides y la estructura y una disminución de las defensas antioxidantes (Gadea *et al*, 2004).

3.4. Reproducción asistida

La infertilidad es considerada como la incapacidad de poder concebir y por lo tanto dar una descendencia debido a dos causas: la infertilidad femenina y masculina. Se considera a la infertilidad masculina como uno de los factores que más contribuyen a la infertilidad a la hora de concebir. Esta infertilidad masculina puede estar ocasionada por un número deficiente de espermatozoides en el eyaculado, espermatozoides con baja tasa de movilidad, espermatozoides afuncionales o por infecciones. Consecuencia de la infección seminal es la producción anómala de leucocitos, que puede estar asociada con un aumento de las sustancias reactivas al oxígeno.

La infertilidad, tanto procedente de un sexo como de otro, puede solventarse mediante técnicas de reproducción asistida. La fecundación in vitro, y más concretamente la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), es la solución a la infertilidad masculina ya que el investigador introduce a través de una pipeta el espermatozoide en el ovulo asegurando al 100% la fecundación, permitiendo, en el caso de la infertilidad masculina solucionar el problema pero para ello se ha de obtener un material adecuado para la utilización de estas técnicas teniendo el gran obstáculo de las ERO por delante ya que un espermatozoide dañado a nivel estructural como funcional no es signo de una buena fertilidad y por ende de una buena fecundación.

Las técnicas de selección de espermatozoides para la reproducción asistida son las siguientes:

MACS (Magnetic Activated Cell Sorting). Es una técnica que permite la selección inmunomagnética de espermatozoides sanos y óptimos para la fertilización del óvulo separándolos de aquellos con marcadores apóptóticos (Alteraciones a nivel de membrana citoplasmática), destinados a morir. Esta técnica esta especialmente pensada para su utilización en tratamientos tanto de inseminación Artificial como de Fecundación "in Vitro" o Microinyección espermática.

- ¿En qué consiste la técnica?

La técnica se basa en la utilización de micro-esferas magnéticas, que llevan adosadas en su pared anticuerpos específicos capaces de reconocer distintos marcadores en membrana de los espermatozoides. Uno de los marcadores que se expresan es la presencia de residuos de fostatidilserina en la membrana externa que al ser reconocidos por los anticuerpos adosados a las micro-esferas y pasarlos por un campo magnético atravesando el mismo solo los que carezcan de ese residuo. Permitirá su separación del resto de espermatozoides sanos que pasaran hasta el final de la columna.

Esta técnica esta especialmente indicada en los siguientes casos: Pacientes con mala calidad espermática, pacientes con más de dos ciclos de tratamiento sin gestación y pacientes con abortos de repetición.

El IMSI (Intra-cytoplasmic Morphologically-selected Sperm Injection). Es una técnica muy sofisticada de selección espermática. Esta técnica fue introducida de manera pionera en 2009. El IMSI permite a nuestros biólogos seleccionar aquellos espermatozoides sin defectos o con menos alteraciones para llevar a cabo la microinyección espermática y, de esta forma, incrementar las tasas de implantación y embarazo.

- ¿Cuándo está Indicada?

En principio esta técnica está pensada para cualquier pareja que vaya a ser sometida a un ciclo de Fecundación "In Vitro" con microinyección espermática pero con especial atención en parejas con muestras de semen Oligo-Terato-Astenozoospermicas, y en aquellas pacientes con fallos previos de FiV (Fecundación "in Vitro")

3.5. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología en la que se miden múltiples parámetros de una célula o partícula una vez sido marcada por fluorocromos en suspensión dentro de una población heterogénea. Para ello hacemos pasar dichas células, a velocidad constante dentro de un flujo laminar, a través de un cámara de flujo sobre la que incide un haz de luz a una longitud de onda específica. Como consecuencia del impacto, se produce una dispersión de luz policromática generada por los diferentes fluorocromos que es captada por diversos sensores. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por ordenador (Shapiro, 2003). Los datos generados se analizan mediante varios software aportando información acerca de sus características estructurales y funcionales de las células.

El objetivo del análisis por fluorescencia en citometría de flujo es asignar a cada célula un grupo específico de células que compartan propiedades comunes. El primer paso es identificar las células de interés, posteriormente se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la proporción o el número de células que poseen un determinado marcador.

El análisis por citometría de flujo representa una de las herramientas más objetivas y precisas para analizar y cuantificar la integridad de las células.

3.6. Antecedentes

Revisiones bibliográficas previas han puesto de manifiesto que los radicales libres y especies reactivas del oxígeno se relacionan con el estrés oxidativo y es probable que desempeñen una serie de importantes funciones a nivel reproductivo. La generación excesiva de especies reactivas del oxígeno por los espermatozoides anormales y por los leucocitos contaminantes ha sido identificada como uno de las etiologías definidas de la infertilidad masculina. El estrés oxidativo de los espermatozoides está directamente relacionado con la disminución de la supervivencia y la capacidad fecundante después de ser eyaculados.

3.6.1 Estudios previos

Previamente a este estudio se han llevado a cabo otra serie de experimentos en base a otros modelos animales cuyo objetivo ha centrado a todos en la preocupación en una conservación seminal óptima para mejorar las condiciones de estrés al que están sometidos los espermatozoides tras la criopreservación con el fin de encontrar unas condiciones adecuadas para una preservación óptima que propicie un buen uso de ese material espermático mediante la relación entre la utilización de GSH y la viabilidad tras la descongelación:

Estudio llevado a cabo con el semen de toro en el que se pretendía comprobar el efecto del antioxidante GSH antes y de después de la congelación, es decir, si el antioxidante actuaba eficazmente contra las especies reactivas del oxígeno permitiendo el mantenimiento de la motilidad del espermatozoide obteniendo como resultado un buen mantenimiento de la motilidad con poca cantidad de GSH externa (Bilodeau *et al*, 2001).

Otro estudio, con semen de conejo se basó en la comprobación de los efectos de la suplementación de glutatión reducido y glutatión oxidado en semen congelado una vez que se hubiera estabilizado con DMSO en el proceso de congelación y post-descongelación. Las principales conclusiones que surgieron de este estudio son que (a) La aplicación de GSH no resultó ninguna mejora en las pruebas funcionales de los espermatozoides (b) no se observaron diferencias significativas en la tasa de recuperación del semen congelado tratado con GSH. En conclusión, la adición de glutatión oxidado y reducido no parece jugar un papel importante en la defensa

antioxidante durante el enfriamiento y congelación del esperma de conejo (Marco-Jiménez *et al*, 2006).

En otro estudio se realizó con semen de carnero con el objetivo determinar los efectos de los antioxidantes en el semen después de la congelación-descongelación de semen de carnero. Tras la experiencia, después de la descongelación, la motilidad en comparación con los otros grupos de tratamiento con ERO no se observaron diferencias significativas en la viabilidad tras suplementación con antioxidantes, llegando a la conclusión de que los antioxidantes tienen una importancia amortiguadora de las especies reactivas del oxígeno en el semen de carnero siendo este un avance para mejorar la producción (Bucak *et al*, 2008).

El objetivo de otro estudio del semen de carnero fue determinar los efectos de la adición de los antioxidantes de glutatión oxidado, albúmina sérica bovina, cisteína y el licopeno a los medios de congelación para determinar las características de post-descongelación como movilidad, morfología, integridad acrosómica, viabilidad e integridad de la membrana. Los resultados evidenciaron que la adicción de GSH protege a los espermatozoides de las especies reactivas del oxígeno previa descongelación (Uysal y Bucak, 2007)

En este estudio se realizó una experiencia usando el semen del jabalí para poder analizar la capacidad de fecundación de los espermatozoides de verraco antes y después de la criopreservación. El efecto de la adición de GSH a la congelación y descongelación no tuvo un efecto significativo sobre los parámetros del semen o la capacidad de fecundación esperma después de la descongelación. Por el contrario, cuando GSH se añadía a la descongelación, tendía a aumentar la capacidad de fecundación del espermatozoide, aunque no se observaron diferencias en los parámetros del semen (Gadea *et al*, 2004]

Otra línea de investigación fue realizada con semen de cabra de Angora y basó el estudio en determinar la influencia de los antioxidantes en parámetros como la peroxidación lipídica después de la congelación-descongelación de semen caprino. Después de la evaluación de los parámetros de calidad del semen se encontró una mejoría significativa en la mortalidad de los espermatozoides, en comparación con los controles sin congelar (Atessahin *et al*, 2008)

La última línea de investigación con modelos animales en este aspecto hasta la fecha se basó en el uso de semen de cabra para evaluar los efectos de los suplementos de GSH en la descongelación de los espermatozoides. Las principales conclusiones de este estudio fueron que la adición de GSH en la descongelación frente a la no adicción dio lugar a: (a) una mayor movilidad y motilidad progresiva; (b) un mayor número de espermatozoides viables capacitados; (c) mayor número de espermatozoides con acrosoma intacto; (d) una reducción de ERO y (e) menor condensación de la cromatina. En un segundo estudio, la adición de reducido proporciono una serie de beneficios: La adición de GSSG para la protección frente la descongelación fue menor en comparación con los espermatozoides tratados con GSH siendo un gran beneficio para mejorar la función y capacidad fertilizante de espermatozoides congelados (Gadea *et al*, 2013).

3.7. Justificación y objetivos

En el marco de la infertilidad a nivel global, según un informe reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el mundo hay casi 50 millones de parejas infértiles, no variando la infertilidad en los últimos veinte años a pesar de los grandes avances en medicina reproductiva.

La tasa de infertilidad en España se sitúa entre el 15% y el 17% de la población según el V Congreso Internacional sobre medicina reproductiva que organiza el grupo IVI. Se ha subrayado que el 3% de los bebés españoles nacen por técnicas de reproducción asistida. El 40% de los casos de infertilidad se deben a problemas masculinos, otro 40% a femeninos y el 20% a causas mixtas o desconocidas. La tasa de infertilidad puede estar afectada por los hábitos de vida y ambientales.

Es sabido que la congelación provoca una disminución en el sistema antioxidante y aumenta los niveles de ERO tras las criopreservación (Wang *et al*, 1997), (Lasso, 1994) y (Álvarez y Storey, 1992). Es coherente pues explorar nuevas estrategias en un intento de superar el daño relacionado con el estrés oxidativo mediante el uso de antioxidantes. Además, la conservación espermática representa una herramienta útil tanto a nivel de ámbito veterinario como médico en la gestión de la producción animal favoreciendo una mayor capacidad de fertilización, viabilidad del material y ahorro económico al permitir una producción animal elevada y sin

incidencias reproductivas. A día de hoy existen diversos estudios en diferentes modelos animales que aportan disparidad de resultados pero que se focalizan en un objetivo común: en qué condiciones son imprescindibles los antioxidantes, objetivo que aún no está determinado por la variabilidad de los resultados posiblemente a que cada especie guarda sus propias peculiaridades en cuanto a conservación y a las condiciones en las que se ha de preservar.

En el presente estudio se analizará el esperma de ratón tras diferentes condiciones de congelación-descongelación y suplementación con GSH para averiguar los efectos que estas alteraciones pueden causar en los espermatozoides y a la fertilidad masculina con el fin de comprobar la pérdida de funcionalidad de los espermatozoides por la presencia de grandes cantidades de ERO. Es motivo de gran interés y preocupación en el campo de la conservación seminal, cuyo objetivo principal es evidenciar la importancia que tiene en la conservación espermática la producción de ERO en un modelo animal para ayudar en la conservación seminal y tratamiento de la infertilidad masculina a fin de mejorar la producción animal y las técnicas de reproducción asistida para encaminar la eficiencia reproductiva y por último valorar el efecto de la temperatura y el pH en la calidad y conservación seminal para evaluar la condición de estrés oxidativo para el tratamiento de la infertilidad masculina mediante el uso de antioxidantes y diluyentes adecuados. Es importante desarrollar métodos de diagnóstico preciso, económico y asequible para identificar la presencia del estrés oxidativo en el semen. Adicionalmente, es necesario avanzar en métodos basados en la intervención con antioxidantes o manipulación del sistema redox que permitan proteger al esperma del estrés oxidativo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención del material y muestras

El material utilizado para la realización de este trabajo procede de las muestras obtenidas previamente en las prácticas de la asignatura Bases Biológicas de la Reproducción Humana. El material utilizado consiste en esperma de ratón procedente del epidídimo. Se han utilizado muestras frescas de esperma obtenidas

en las prácticas de la asignatura y material congelado que previamente se había almacenado a -80°C .

El aparato reproductor masculino, el que nos ocupa, está constituido por una serie de órganos, conductos y glándulas, del conjunto de la gónada nos centraremos en el epidídimo. El epidídimo es un conducto situado en la parte superior del testículo, donde tiene lugar la maduración y capacitación de los espermatozoides. Se trata de túbulos contorneados revestidos de epitelio con cuerpos multivesiculares que tienen función absorbente que permite reemplazar ciertos líquidos seminales por otros que mejoren la movilidad de los espermatozoides. En éste tiene lugar la acumulación y almacenamiento de los espermatozoides adquiriendo gradualmente la capacidad de fecundar y la movilidad conforme lo atraviesan.

Tras la obtención del epidídimo y la extracción de los espermatozoides del epidídimo, antes de que se desaglutinen y dispersen por la placa se van pasando a tubos eppendorf con ayuda de una micropipeta y conservados a 37°C , la temperatura a la que deben de estar constantemente para una correcta conservación de los mismos ya que es la temperatura escrotal normal.

Previamente a la experimentación se ha de preparar el diluyente TRIS-glucosa basado en una solución tampón (mantiene el pH alrededor de 8) cuya preparación se lleva a cabo en un tubo falcon mediante la adicción de 0.32 g de TRIS, 0,16g de ácido cítrico, 0,24 de glucosa, 15mL de agua destilada y 2,86% de yema de huevo; y una solución ácida de ácido cítrico: 25 mL de agua destilada y 2,5 g de ácido cítrico. Este diluyente permitirá una buena conservación de los espermatozoides a la hora de la criopreservación y durante la experimentación.

4.2. Diseño experimental

La fase experimental se subdividió en dos experimentos. En el primero ellos se procedió a realizar un análisis seminal cualitativo básico que nos permitió conocer algunas características macroscópicas y microscópicas de los espermatozoides pre y post criopreservados, mediante la evaluación del pH en el caso del análisis macroscópico y la movilidad, la morfología y la vitalidad en el caso del análisis microscópico. La segunda experiencia se basó en el análisis de de las muestras vía citometría de flujo antes y después de la criopreservación de los siguientes

parámetros (i) estado de la membrana lipídica mediante el uso de Meriocianina 540 (ii) producción de especies reactivas del oxígeno mediante el uso de 2'-7'-Dicloro-dihidro-fluorecein-diacetato (iii) y por último la detección del estado de la condensación e integridad de la cromatina del espermatozoide mediante el Ioduro de propidio.

4.2.1. Análisis Macroscópico y microscópico

Para este análisis se precisa de muestras del semen fresco que se han de analizar en el mismo momento de la obtención del material para que el tiempo de espera no pueda afectar a la movilidad del esperma. Tras la obtención del semen, los espermatozoides son depositados en un eppendorf con medio diluyente TRIS-glucosa separándose una parte para ser criopreservados mediante congelación rápida con nitrógeno líquido y conservados a -20°C para mantener la cadena de frío mientras se trabaja con los espermatozoides frescos, que se separan por otro lado conservándose a 37°C y a los cuales se los analizará primero procediéndose a la determinación del pH mediante tiras reactivas del rango 1-12 y la determinación de la movilidad, vitalidad y morfología siguiendo la siguiente metodología que se realizará de la misma manera tanto en fresco como en congelado tras su descongelación.

4.2.1.1. Movilidad

El método tradicional para determinar la motilidad espermática consiste en utilizar una gota de semen que se deposita entre un porta y un cubre para evaluar el movimiento de los espermatozoides, generando así una película fina que permita determinar de forma más o menos precisa el número de células móviles presentes en la muestra, e incluso realizar una valoración de si el tipo de movimiento observado es normal o no. Se observan varios campos por muestra utilizando para ello un microscopio óptico a 20-40x. Visualización ha de ser rápida pues es dependiente de temperatura. El procedimiento es el mismo para semen fresco que para el congelado (previa descongelación a 37°C).

4.2.1.2. Vitalidad

La vitalidad consiste en la evaluación de los espermatozoides con y sin daños a nivel de membrana plasmática, distinguiendo entre vivos y muertos por ese parámetro mediante el uso del colorante Eosina-nigrosina, que tiñe los

espermatozoides, para ello, la preparación del colorante se lleva a cabo disolviendo 0,67 g de eosina Y. y 0,9 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada de agua en un vaso de precipitados de vidrio colocado en una placa caliente de agitación. Se calienta suavemente y se añade 10,0 g de nigrosina y se disuelve antes de que hierva. Tan pronto ebulle se retira el vaso de la placa caliente y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se cuela mediante papel de filtro para eliminar posibles grumos y se conserva a 4°C en el frigorífico.

Para observar la vitalidad se procede mezclando volúmenes iguales de semen y tinción, así pues se añade 50ul de eosina-nigrosina a 50ul de semen en un tubo eppendorf y se mezcla bien. Después de 30 segundos a T^a ambiente, se transfiere una gota de 12ul de la mezcla sobre un portaobjetos y se realiza un frotis depositando la gota en un extremo del portaobjetos y deslizando el cubre hacia el otro extremo para dejar una capa más o menos homogénea extendida. Posteriormente se deja que el portaobjetos se seque al aire y se coloca una gota de medio de montaje y se cubre con un cubreobjetos. Realizado esto se examina el portaobjetos bajo objetivo de x100 con aceite de inmersión observando los espermatozoides vivos que se quedan sin teñir debido a que su membrana permanece intacta y los espermatozoides muertos que se tiñen debido que poseen la membrana dañada.

4.2.1.3. Morfología

La determinación de la morfología del espermatozoide se lleva a cabo mediante la tinción con hematoxilina, mezclándose 20 µl de semen y 20 µl de colorante, mezclándose en un eppendorf. Posteriormente, se deposita una gota sobre el portaobjetos y se pone un cubreobjetos y se observa con el objetivo x100 con aceite de inmersión para el análisis de las formas.

4.2.2. Tratamiento con fluorocromos y análisis por citometría

Los espermatozoides se depositan mediante una pipeta pasteur en varios eppendorf con medio TRIS-glucosa glicerol conservados a una temperatura de 37°C. Los destinados a la congelación se someten a criopreservación con nitrógeno líquido, llevando a cabo una congelación rápida del material y posterior conservación en el congelador a -20°C hasta su uso para mantener la cadena de frío, llevándose en ellas las mismas prácticas que con el fresco tras su descongelación. Las

muestras de líquido seminal frescas se centrifugan a 800-1000 x g x 5min para la separación de los espermatozoides del sobrenadante, dejando un leve pellet que se resuspenderá y se dividirá en muestras de 0,5 mL para los diferentes experimentos.

4.2.2.1. Evaluación del estado de la membrana lipídica

Cuando un espermatozoide, al igual que cualquier célula, sufre alguna alteración, la fase inicial de su daño se caracteriza por una pérdida en la simetría de los fosfolípidos de membrana que provoca el inicio de la apoptosis celular. La M540 es una tinción hidrofóbica y lipofílica muy sensible a los cambios en la conformación de la membrana, usada para monitorizar el desorden lipídico de la membrana celular y acrosomal. Para detectar incrementos de desorden en la estabilidad de la membrana plasmática y acrosomal, en cuatro eppendorf, dos a dos con 0,5mL de esperma fresco y congelado (previa descongelación a 37°C) respectivamente, tras centrifugación (800-1000 x g x 5min), a uno de los eppendorf con semen fresco y congelado (previa descongelación a 37°C) se les añade 50µl de GSH y a todos se les añade 1,25 µl de una solución madre de M540 1mM a cada uno dejándose incubar 24 h a temperatura constante. Posteriormente las muestras fueron analizadas por el citómetro a una absorbancia de 540 nm para ver el grado de fluorescencia que emitían los espermatozoides en función del desorden que mostrasen.

4.2.2.2. Producción de ERO

El 2'-7'-Dicloro-dihidro-fluorecein-diacetato (H₂DCFDA) es el fluorocromo indicador de la generación de ERO en las células; es un componente no fluorescente, permeable a las células estables que es des-esterificada intracelularmente y se convierte en una sustancia altamente fluorescente. Una vez oxidado, emite fluorescencia verde, que es colectada por citometría de flujo con una absorbancia de 525nm. H₂DCFDA en una concentración de 0,25µM fue añadido a dos eppendorf con 0,5mL de semen congelado (tras descongelación a 37°C), añadiéndole a uno de los dos eppendorf 50µl de GSH dejándose incubar a temperatura constante durante hora y media.

4.2.2.3. Determinación de la condensación de la cromatina

Una alteración en la integridad y estado de la cromatina del espermatozoide, si bien en buenas condiciones puede permitir la penetración del oocito y el correcto desarrollo del embrión, fracasa. El Ioduro de propidio es un agente intercalar y una

molécula fluorescente que se integra en el ADN y que se utiliza para evaluar el estado de condensación e integridad de la cromatina (Gadea *et al*, 2005) ya que esto está relacionado con la capacitación. El IP es impermeable a la membrana y generalmente excluido de las células viables por lo que determina también la viabilidad celular.

Utilizamos el fluorocromo para evaluar el estado de la cromatina, para ello, tras centrifugar (800-1000 x g x 5min) y retirar el sobrenadante a dos eppendorf de espermatozoides frescos y dos congelados (previa descongelación a 37°C), a todos ellos le añadimos una solución de etanol y tampón fosfato salino (PBS) en una concentración 70% etanol y 30% de PBS a cada uno. Posteriormente, a un eppendorf de los espermatozoides frescos y otro de los espermatozoides congelados (que hasta ahora llevan el mismo tratamiento) se les añade 50 µl de una disolución de ácido cítrico y durante 30 minutos se incuban los cuatro eppendorf. La solución de etanol y PBS inducirá la permeabilización de la membrana del espermatozoide al fluorocromo IP. Posteriormente se retiró la solución de etanol-PBS y cítrico tras centrifugar (800-1000 x g x 5min) y retirar el sobrenadante y se añadió el fluorocromo IP a una concentración de 2,5 g/ml a los cuatro eppendorf. La incubación se realizó en oscuridad durante una hora. Tras la incubación las muestras se analizaron mediante citometría de flujo a una absorbancia de 650nm.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis Experimental 1

Tal y como se ha indicado en su correspondiente apartado, mediante el análisis seminal se tenía como objetivo analizar determinados parámetros espermáticos con el fin de poner de manifiesto alteraciones que pueden derivar en enfermedades relacionadas con la infertilidad masculina así como expresar las condiciones en las que se encuentra el espermatozoide con unos valores más o menos aproximados. Los valores establecidos como normales son los determinados para ratón siendo un valor muy orientativo para la extrapolación a los establecidos para los humanos.

Análisis Macroscópico: Muestras en fresco y expuestas a congelación fueron usadas para la determinación del pH mediante el uso de una tira de pH con rango de 1-12 obteniendo:

1-12	Semen Fresco	Semen congelado
pH	7	6,5

Tabla 1. Valores de pH para muestras de semen fresco y congelado.

El valor de pH de referencia se encuentra por encima de 7.2 y alcanza el máximo en 8.2 siendo valores inferiores a 7 indicadores de padecer Azoospermia (ausencia de espermatozoides) ,obstrucción de conductos eyaculadores o procesos inflamatorios en el caso de no padecer Azoospermia. Valores superiores indicarían enfermedades agudas en las vesículas seminales o bien debido a liberación de dióxido de carbono provocando un consecuente aumento del pH.

En el caso del semen fresco (Tabla 1) se podría determinar que está en el límite de tolerancia del pH 'neutro' del espermatozoide pudiendo incluso a ese nivel indicar indicios de pérdida de espermatozoides por inicios de Azoospermia. En cambio, en el semen expuesto a la congelación rápida (Tabla 1) de la criopreservación se puede observar una acidificación más acusada que deriva en una clara Azoospermia tal y como los valores de referencia lo describen. Esto pone de manifiesto que los espermatozoides toleran mejor el medio básico que el ácido, ya que una mínima variación hacia abajo del pH supone grandes consecuencias para el material e integridad espermática.

Análisis microscópico: De los análisis de movilidad, vitalidad y morfología, tanto en muestras frescas como congeladas se obtuvieron los siguientes resultados:

- Movilidad

Las moviidades observadas tras el análisis de muestras tanto recién obtenidas del epidídimo como las criopreservadas fueron cuantificadas en base a una "n" o muestra de 100 espermatozoides sobre los cuales se les identificaría diferentes parámetros, como la movilidad-inmovilidad y el grado de movilidad registrada en porcentaje sobre 100.

El rango de movilidad espermática se clasifica en cuatro categorías:

- Tipo a movilidad progresiva.
- Tipo b movilidad lenta o perezosa.
- Tipo c o movilidad no progresiva.
- Espermatozoides inmóviles.

Se considera que una muestra de semen tiene una movilidad normal cuando hay un 80-95% o más de espermatozoides con movilidad. Cuando no se cumplan este parámetro se considera que existe Astenozoospermia.

Los resultados obtenidos del recuento de ambas muestras permiten observar que el semen fresco supera el margen mínimo de la normalidad al presentar un 88% de la movilidad espermática incluso el índice de movilidad progresiva es elevada con respecto el resto de las categorías, debido quizás en parte a que las condiciones a las que se encontraba en el epidídimo no habían variado demasiado desde su extracción, por eso es crucial mantener una temperatura adecuada para no alterar el curso normal de la conservación espermática. En cambio, en la muestra criopreservada con respecto a la fresca se puede ver una gran variación en la tasa de móviles (Tabla 2), quedando bastante por debajo de la tasa de normalidad establecida, pudiéndose considerar patológico al presentar un 38% de movilidad, padeciendo Astenozoospermia o disminución de la tasa de movilidad, lo que quiere decir que la congelación o, en otras palabras, el cambio de temperatura a afectado de manera significativa a la movilidad, dándose categorías de movilidad de más baja calidad con respecto el semen fresco, condición sin equánim de que esos espermatozoides inmóviles en ambas muestras estén muertos, este parámetro solo marca la movilidad de la célula espermática.

Movilidad espermática		
n=100	Fresco	Congelado
MÓVILES	88%	38%
Tipo A	50%	-
Tipo B	23%	17%
Tipo C	15%	21%
INMÓVILES	12%	62%

Tabla 2: Porcentaje de movilidad en ambas muestras.

- Vitalidad

La determinación de la vitalidad se llevó a cabo mediante la utilización de la tinción de eosina-nigrosina que tiñe células muertas dejando las vivas sin teñir, llevando a cabo un conteo de un número de muestra de 100 espermatozoides sobre los que analizó la viabilidad o no viabilidad y se expresó en porcentaje sobre 100.

La proporción de espermatozoides vivos que ha de haber en el eyaculado ha de ser mayor o igual del 58%. Si el valor es inferior se habla de una Necrozoospermia.

De las muestras cuantificadas se obtuvo un gran porcentaje de vitalidad en el caso de la muestra fresca superando el margen, un 91% frente al 32% de la muestra congelada lo que, como en la otra ocasión, indica que la congelación afecta en gran medida a la integridad del espermatozoide dándose en este caso un cuadro de Necrozoospermia (Tabla 3). En este caso se podría decir que existe cierta correlación entre la movilidad y la vitalidad, al darse porcentajes muy similares entre vivos-móviles, muertos-inmóviles en ambas muestras.

Vitalidad espermática		
n=100	Fresco	Congelado
Teñidos	9%	68%
Sin teñir	91%	32%

Tabla 3: Porcentaje de vitalidad de los espermatozoides.

o Morfología

Se observó la morfología de las muestras mediante una tinción simple con Hematoxilina con el fin de evaluar las características morfológicas de los espermatozoides. Una correcta morfología espermática es necesaria para que el espermatozoide pueda tener una buena movilidad y sea capaz de fecundar el ovocito.

El valor de referencia por el cual se considera que una muestra presenta teratozoospermia es cuando el número de espermatozoides morfológicamente normal es inferior al 4%.

Se llevó a cabo un conteo de una muestra de 100 espermatozoides. Del recuento de formas de las dos muestras se obtuvieron porcentajes muy similares de formas normales y anormales (Tabla 4) superando el margen por lo tanto su

morfología parece correcta, determinante para una buena fecundación pero no siendo el único factor a tener en cuenta a la hora de la fecundación.

Morfología		
n=100	Fresco	Congelado
F. normales	97%	95%
F.Anormales	3%	5%

Figura 4: Porcentaje de formas.

5.2. Análisis Experimental 2

Con la intención de establecer el estado tanto estructural como funcional del espermatozoide se realizaron estas tres pruebas que determinan el estado de sus diferentes componentes mediante fluorescencia. Antes de analizar los tratamientos con fluorescencias se realizó un análisis de dos eppendorf con semen. Se puede observar en los gráficos de dispersión una variación en las poblaciones de espermatozoides así como en su homogeneidad entre muestras frescas (fig.1) y congeladas (fig.2), las células se reparten en el grafico indicando el tamaño y forma de las mismas mostrándose en el congelado una mayor variedad de tamaños.

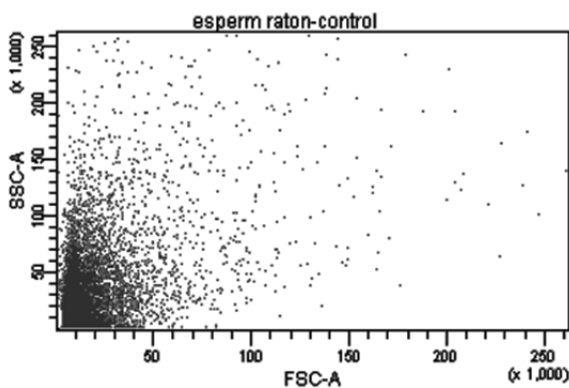


Figura 1. Gráfico de dispersión de la población de espermatozoides en semen fresco. La población es más homogénea.

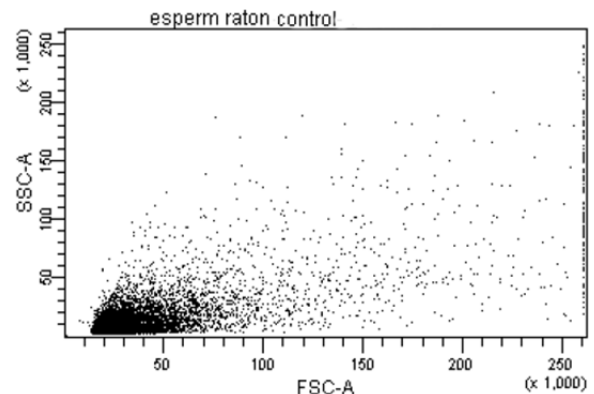


Figura 2. Gráfico de dispersión de la población de espermatozoides en semen congelado. La población es más heterogénea.

- Evaluación del estado de la membrana lipídica

Del tratamiento de las muestras frescas y congeladas con M540 y GSH en el orden de (i) Muestra fresca + M540 (ii) Muestra fresca + GSH + M540 (iii) Muestra congelada + M540 (iv) Muestra congelada + GSH+ M540 y posterior análisis en el

citómetro de flujo se obtuvieron una serie de histogramas haciendo referencia al nivel de desorden plasmático en función de la fluorescencia emitida.

- Muestra fresca + M540

En este histograma podemos observar como la fluorescencia marca cierto desorden a nivel de membrana al darse picos de fluorescencia positivos para M540 (fig. 3), para lo cual es específico este fluorocromo, mostrando que en la muestra fresca existe la presencia de alteraciones en la estructura de la membrana de algunas células, no son niveles especialmente altos, pero, el daño existe.

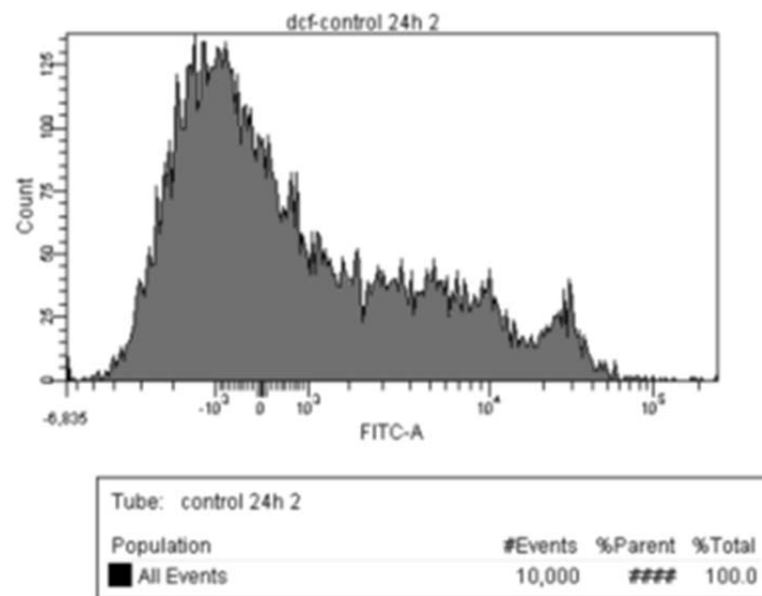


Figura 3. Histograma con tratamiento de M540 sobre la muestra de semen fresco. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

- Muestra fresca + GSH + M540

En este histograma, la adicción de GSH supuso una diferencia ligeramente significativa, variando un poco los picos de fluorescencia con respecto la muestra fresca sin GSH (fig.4), hacia el final se puede observar una disminución de la fluorescencia, por lo que la adicción de este antioxidante de forma exógena parece

responder al tratamiento, manteniendo la integridad de la membrana lipídica y acrosomal ante la acción antioxidante.

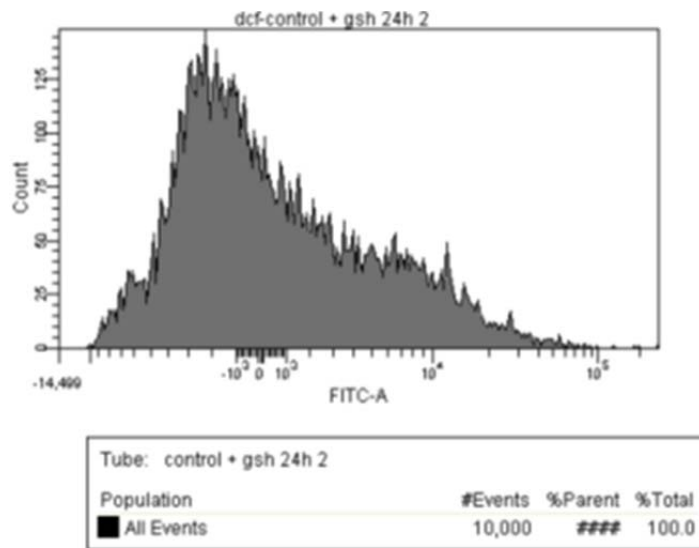


Figura 4. Histograma con tratamiento de M540 con GSH sobre la muestra de semen fresca. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

o Muestra congelada + M540

El histograma de la muestra de semen congelada sometida al fluorocromo, muestra la cantidad de fluorescencia emitida por las células espermáticas, no solo en número de células, sino en intensidad de esa fluorescencia (fig. 5) por lo que se puede decir que existe la presencia de graves daños a niveles estructurales de las células por lo que la congelación afecta significativamente al mantenimiento estructural de la célula espermática.

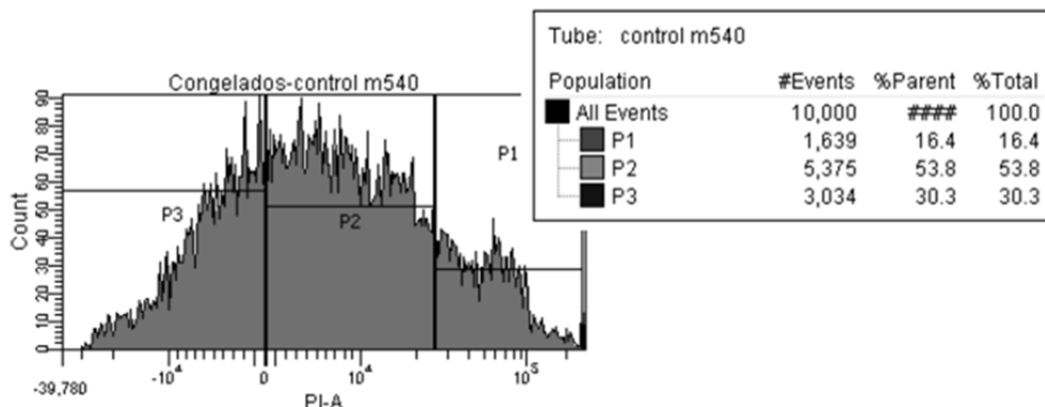


Figura 5. Histograma con tratamiento de muestra congelada con M540. **P2-P1:** fracción de células con mayor cantidad de fluorescencia. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

○ Muestra congelada + GSH + M540

El histograma de la muestra de semen congelado sometido a una adición externa de GSH indica que hay variaciones significativamente positivas con respecto a la muestra congelada sin adición de GSH observándose incluso una disminución de la fluorescencia (fig.6) y de número de células marcadas por lo tanto el grado de daño estructural es significativamente menor.

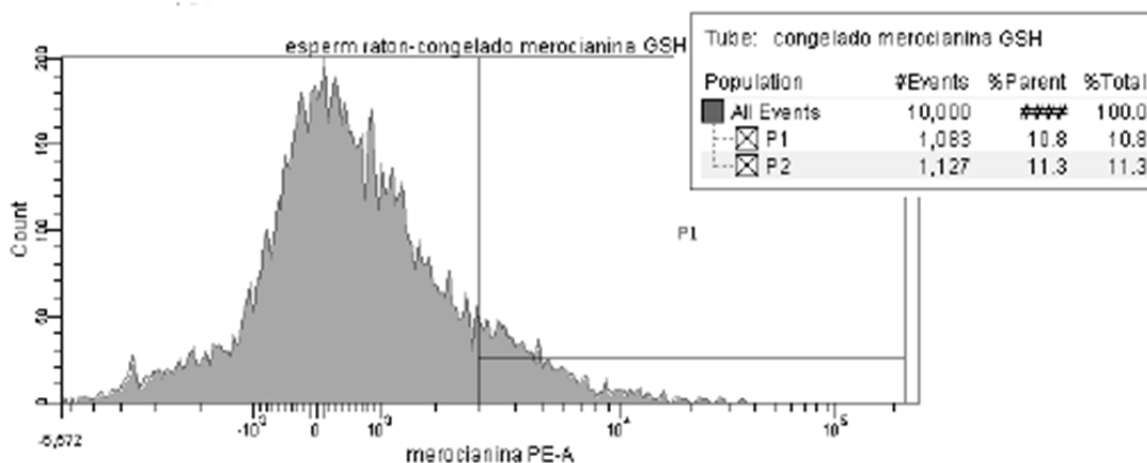


Figura 6. Histograma con tratamiento de muestra congelada con M540. **P1:** fracción de células con mayor cantidad de fluorescencia. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

- *Producción de ERO*

El tratamiento con H₂DCFDA de las muestras y posterior análisis en el citómetro de la actividad que mostraban las muestras ante diferentes condiciones de conservación y antioxidantes derivó en los siguientes resultados los cuales, como se indicó en la metodología siguen el orden de: (i) Muestra congelada + fluorocromo, (ii) Muestra congelada + GSH + Fluorocromo.

○ Muestra congelada + H₂DCFDA

El histograma muestra unos niveles de fluorescencia que van disminuyendo conforme aumentan los marcadores de fluorescencia (fig.7) lo que indica que la producción de ERO en esta muestra congelada es importante, aunque no excesiva, pero puede correr el riesgo de producirse daños graves en la integridad celular.

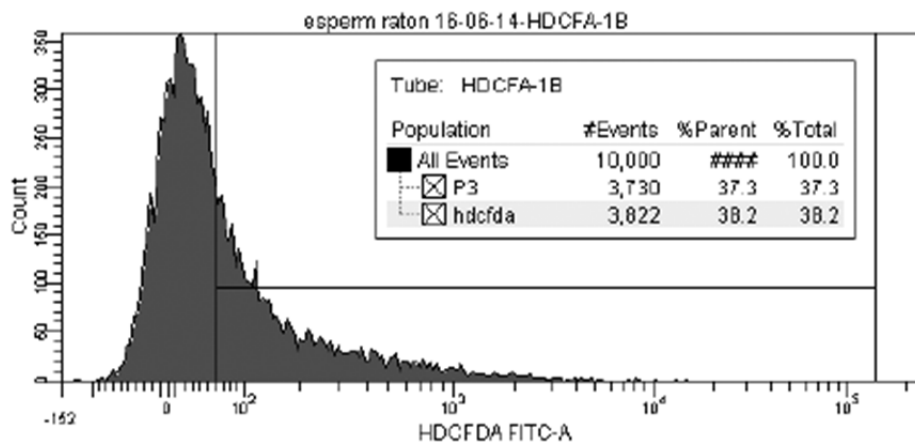


Figura 7. Histograma con tratamiento de H₂DCFDA de la muestra de semen congelada. **P3:** Fracción de células con mayor cantidad de fluorescencia. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

o Muestra congelada + H₂DCFDA + GSH

En la muestra congelada sometida a GSH externo se puede ver como hay una disminución de la fluorescencia conforme aumentan los marcadores (fig. 8) y por tanto de la producción de ERO, lo que verifica la actividad antioxidante del glutatión reducido añadido externamente evitando un posible daño celular con respecto al congelado sin GSH externo ya que cualquier desbalance en el equilibrio redox y su consecuente disminución puede provocar graves alteraciones a cualquier nivel.

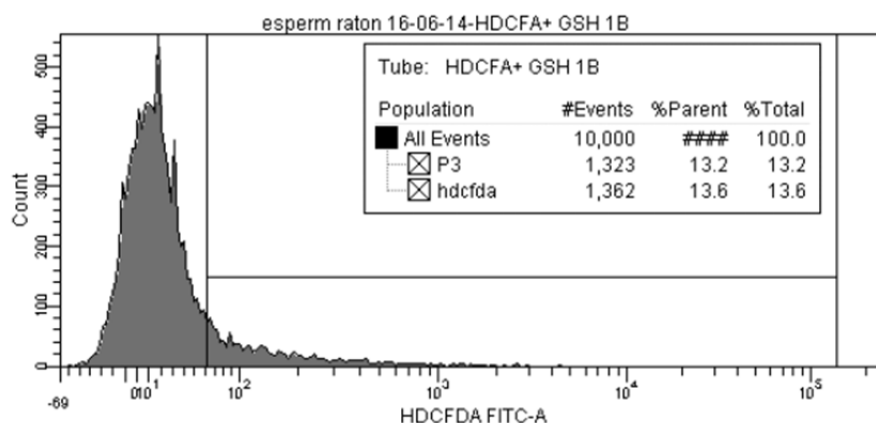


Figura 8: Histograma con tratamiento de H₂DCFDA de la muestra de semen congelada con la adición externa de GSH. **P3:** Fracción de células con mayor cantidad de fluorescencia. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

- *Determinación de la condensación de la cromatina*

El tratamiento con Ioduro de propidio para establecer la integridad de la cromatina en función de la fluorescencia fue aplicado tanto en fresco como en congelado y analizado en el citómetro de flujo según los siguientes tratamientos (i) Muestra fresca + IP, (ii) Muestra fresca + Ac cítrico + IP (iii) Muestra congelada + IP (iv) Muestra congelada + Ac. Cítrico + IP. En esta técnica, la intensidad de la señal fluorescente es proporcional a la unión del fluorocromo al ácido nucleico. El semen, debido a su localización tras la obtención, en el epidídimo, una vez capacitado el espermatozoide, su ADN se encuentra condensado hasta la unión del ovulo que debe de descondensarse pero las ERO provocan una hipercondensación (Gadea *et al*, 2013) a nivel de la cromatina dificultando su posterior descondensación y por lo tanto la formación del pronúcleo masculino a la hora de la fecundación.

o Muestra fresca + IP

En el histograma se puede observar como la muestra de semen fresco con tratamiento de IP emite fluorescencia indicando que el ADN está en buen estado y su integridad es estable (fig. 9).

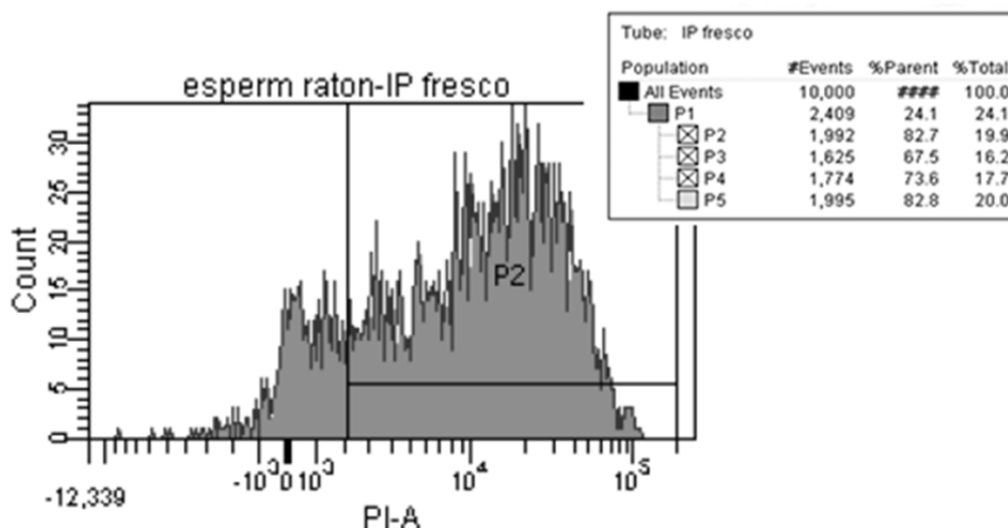


Figura 9. Histograma con tratamiento de la muestra fresca de semen con IP. **P2:** Fracción de células con mayor cantidad de fluorescencia. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

○ Muestra fresca + pH + IP

En el histograma se puede observar la muestra fresca de espermatozoos sometida a una bajada de pH y a IP, mostrándose una bajada de la fluorescencia y por tanto de la integridad del ácido nucleico (fig. 10) por lo que la disminución de pH parece haber tenido efecto sobre la integridad del ADN.

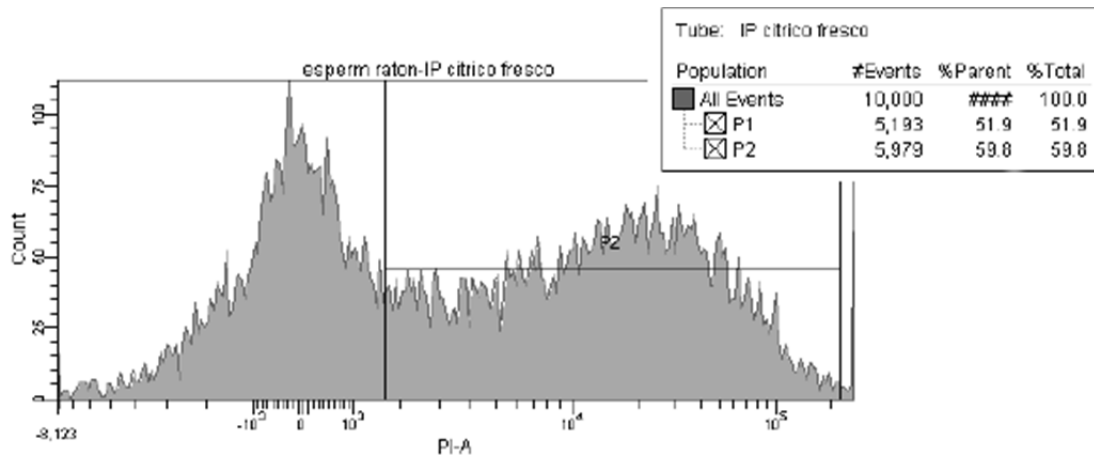


Figura 10. Histograma con tratamiento de la muestra fresca de semen con IP+ Ac. Cítrico. **P2:** Fracción de células con mayor cantidad de fluorescencia. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

○ Muestra congelada + IP

Según el histograma se puede observar que la integridad de la cromatina es alta y la condensación de la cromatina es correcta al detectarse un gran grado de fluorescencia en la muestra de semen congelado (fig. 11) con respecto al fresco, por lo que la congelación-descongelación no parece afectar a la integridad de la cromatina. No aparecen diferencias significativas por lo tanto concluimos que la congelación no tiene efecto sobre la integridad de la cromatina.

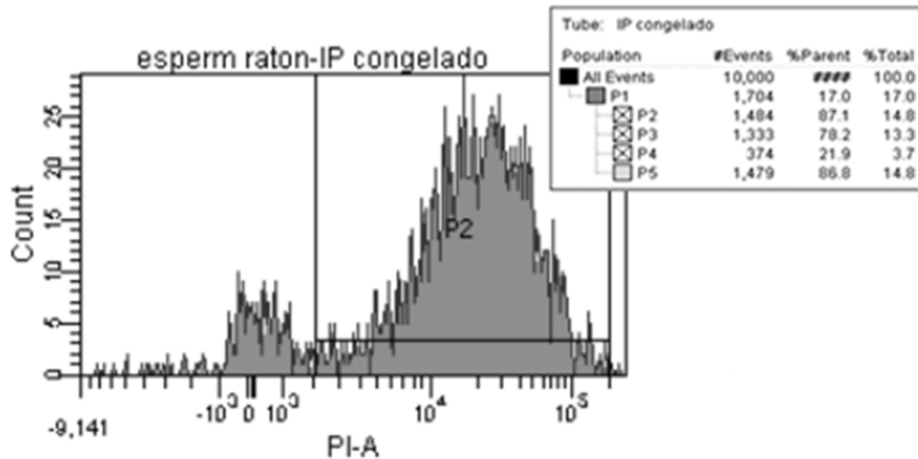


Figura 11. Histograma con tratamiento de la muestra congelada de semen con IP. **P2:** Fracción de células con mayor cantidad de fluorescencia. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

o Muestra congelada + pH + IP

En este histograma se puede observar como la fluorescencia disminuye bruscamente tras la adición de ácido cítrico debido quizás a que la disminución de pH hace al ADN susceptible a ser atacado por ácido cítrico llevando a cabo una desnaturalización ácida (fig.12). Puesto que la desnaturalización está influida por el pH en gran medida, se puede decir que la congelación ha influido poco (al darse niveles altos de fluorescencia en muestra congelada sin ácido). El fluorocromo es específico de ADN condensado e integro y por ello la fluorescencia se reduce bruscamente.

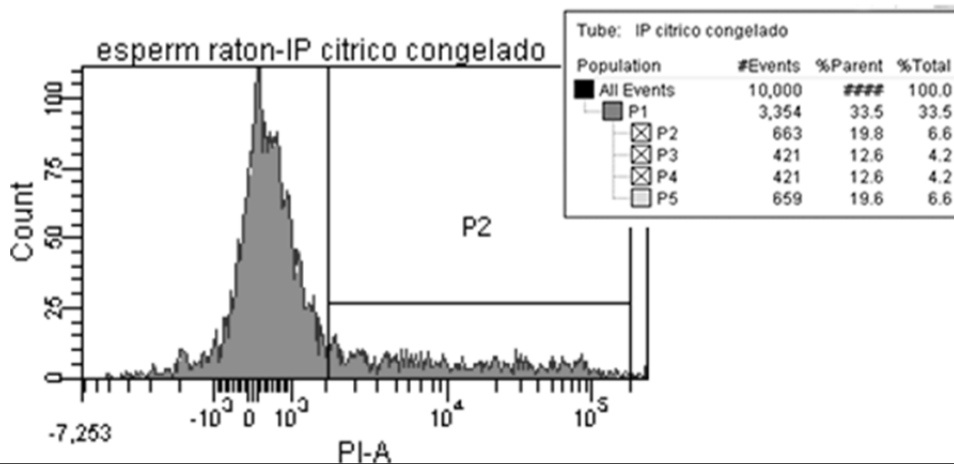


Figura 12. Histograma con tratamiento de la muestra congelada de semen con IP + Ac cítrico. **P2:** Fracción de células con mayor cantidad de fluorescencia. En el eje X del histograma: intensidad de fluorescencia negativa < 0 > intensidad de fluorescencia positiva. En el eje Y: número de células.

6. DISCUSIÓN

Por diversos estudios previos, es sabido que la congelación causa un daño a los espermatozoides, afectando a procesos que influyen negativamente en la fertilización del ovocito, esto podría estar debido a alteraciones en los mecanismos de regulación en los procesos redox y en una alteración en los sistemas antioxidantes de la célula. Este grave efecto de la congelación puede ser revertido mediante la adición exógena de GSH, al invertir ese efecto oxidante que ejerce las ERO sobre los componentes de la célula al actuar como un activo antioxidante. (Gadea *et al*, 2011).

Anteriormente, algunos estudios previos, han evaluado el uso de GSH como compuesto antioxidante en el proceso de congelación- descongelación en muestras de semen de diferentes animales, obteniendo como respuesta diferentes resultados. Un ejemplo es el estudio puesto de manifiesto por Sinha *et al*, 1996, cuyos experimentos demostraron que además de añadir GSH en una concentración 5 Mm para la criopreservación, el medio Tris-glucosa mejoró la tasa de fertilidad de los espermatozoides criopreservados de cabra, en cambio concentraciones inferiores (Gadea *et al*, 2005) lograron un aumento con respecto la otra concentración, siendo la acción del antioxidante dependiente de dosis.

El inicio del proceso de capacitación del espermatozoide está relacionado con una alteración en el equilibrio redox y la actividad de los mecanismos de defensa antioxidante (Aitken *et al*, 1989). Teniendo en cuenta que GSH no es permeable a la membrana plasmática del espermatozoide, su mecanismo de acción no está aún claro. Por un lado, el mecanismo podría estar relacionado con el uso de GSH presente en el fluido extracelular o por medio de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) (Mukhtar y Lee, 1978).

En este, nuestro estudio, habiendo usado espermatozoide de ratón, se puede decir que, tanto a nivel microscópico como macroscópico, ha habido influencia negativa sobre la congelación del semen, llegando a dar niveles patológicos, padeciendo una Azoospermia por acidosis, Necrozoospermia por bajos niveles de viables y Astenozoospermia por una disminución abrupta de células móviles, influyendo en gran medida en la condición de viabilidad y motilidad, factores fundamentales para

una correcta fecundación y por ende comprometen la fertilidad del individuo. Además, mediante la técnica de citometría de flujo obtuvimos una serie de información que nos permite realizar la evaluación del estado de los espermatozoides conservados en medio TRIS, demostrándose que el GSH a una concentración de 5Mm en el esperma de ratón, induce una reducción en la producción de ERO tras la criopreservación, pudiendo también demostrar una reducción del trastorno lipídico a nivel de membrana espermática y acrosomal, estando demostrado que parece mantener la viabilidad espermática por proteger la estructura y función de la membrana(Metabolismo celular, motilidad, capacitación, reacción acrosomal etc....) ya que para una fertilización exitosa se necesita una membrana lipídica íntegra para una correcta interacción entre membrana y óvulo(Gadea *et al*, 2013), además de demostrar que el pH si parece tener efecto sobre la integridad de la cromatina tal y como aparece cuando se emplea las muestras frescas y congeladas con un pH ácido, demostrando también a su vez que la congelación como tal no afecta a la integridad de la cromatina directamente en las muestras congeladas sino por una bajada de pH(tal y como se evidenciaba en el análisis macroscópico).Sin embargo, otros estudios se necesitan para confirmar estos resultados preliminares y determinar la mejor concentración de GSH- condiciones de preservación para proteger a un mayor número de animales de cara a la producción animal y mejora de la infertilidad.

Podemos concluir que en el caso del semen de ratón ,(i) el semen congelado con respecto al fresco muestra un pH mas acidificado debido quizás a que se ve afectado el sistema antioxidante interno de la célula y el estrés oxidativo baja el pH del fluido seminal cuando no se adiciona GSH externo no pudiendo hacer frente a la actividad oxidante, (ii) la congelación parece afectar a la movilidad dándose valores de movilidad reducida (62%) y de baja calidad con respecto al semen fresco (12%) ,(iii) la vitalidad a nivel de semen congelado es bastante más reducida(68% no viables) con respecto el semen fresco(9% no viables) pudiéndose decir que existe cierta correlación entre la movilidad y la vitalidad, al darse porcentajes muy similares entre vivos-móviles, muertos-inmóviles en ambas muestras pudiéndose verse influenciado por esa disminución del pH, (iv) la morfología en ambas muestras eran similares,(v) A nivel del estado del desorden de la membrana lipídica espermática y acrosomal, se puede decir que la adición externa

de GSH mejora la estabilidad e integridad de las membranas ,(vi) en la producción de ERO, la muestra congelada con la adición de GSH exógena muestra una significativa mejoría de la actividad oxidante (vii) y por último , a nivel de estado de la condensación e integridad de la cromatina, en las muestras congeladas y fresca se observa una buena conservación de la integridad de la cromatina, pero la disminución del pH a nivel intracelular provoca una marcada desnaturalización del ADN independiente de la congelación.

Por lo tanto, el efecto de la criopreservación sobre los espermatozoides esta evidenciado y apoyado por múltiples estudios basados en diferentes modelos animales, incluido éste, no obstante, esto abre la puerta a posteriores estudios que retomen el campo en busca de niveles de antioxidantes y diluyentes adecuados para asegurar la preservación total de la viabilidad del espermatozoide ya que es de vital importancia encontrar un mecanismo de preservación a base de diluyentes y antioxidantes tanto en concentración como en efectividad que permita un mejor aprovechamiento del material para su uso posterior mediante la criopreservación sin que los espermatozoides sufran daños que condicione su capacidad fecundante. No obstante, cada especie parece guardar sus propias peculiaridades de cara a la conservación, siendo de vital importancia crear patrones de concentraciones y condiciones en función de la especie porque parece que no todas las especies responden de la misma manera a las ERO.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aitken R J, Krausz C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*; 122(4): 497 – 506.

Aitken R J, Baker H W. 1995. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod*; 10: 1736-1739.

Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*; 41(1):183–97.

Álvarez J G, Storey B T. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*; 13(3):232–41.

Álvarez J G. 2006. Estrés oxidativo, fisiología espermática y reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de fertilidad. XXVI Congreso Nacional SEF.*

Arata-Bellabarba G, Alfonso Osuna J, Roald Gómez J R. 2005. Estrés oxidativo y función espermática: Revisión. *Revista Venezolana de Endocrinología Metabólica.* (3); 12-19.

Atessahin A, Bucak M N, Tuncer PB, Kizil M. 2008. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*; 77(1):38–44.

Baumber J, Ball B A, Linfor JJ, Meyers S A. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl*; 24(4):621-8.

Bilodeau J F, Blanchette S, Gagnon C, Sirard M A. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*; 56(2):275–86.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of botany* 91:179-194.

Brotherton J. 1990. Cryopreservation of human semen. *Archives of Adrology*; 25(2): 181-95.

Bucak M N, Ateşşahin A, Yüce A. 2008.Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*; 75(2–3):128–34.

Cadenas E. 1997.Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*; 58:79-110.

Cárdenas R N, Pedraza, C.J. 2006.Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química*; 17(2):164-173.

Castillo C, Benedito L J, López-Alonso M, Miranda M y Hernández J. 2001. Importancia del estrés oxidativo en el ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch. Med. Vet*; 33(1): 204-218.

Chihuailaf R H, Contreras P A, Wittwer, F G. 2002.Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal *Veterinaria México*. Volumen No 3; 33 265- 283.

Córdova Izquierdo A, Ruiz Lang C G, Córdova Jiménez C A, Córdova Jiménez M S, Guerra Liera J E, Rodríguez Denis B E y Arancibia Salinas K. 2009 .Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 3 (1): 01-38.

Everaert K, Mahmoud A, Depuydt C, Maeyaert M, Comhaire F. 2003.Chronic prostatitis and male accessory gland infection: is there an impact on male infertility. *Andrologia*; 35:325-330.

Gadea J, Gumbao D, Gómez-Giménez B., Gardón J C.2013 .Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa.*Sciencedirect*;13:24-33.

Gadea J, Moll M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez F.A., Gardon J.C. 2010.Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation:Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*. 62 (2011) 40–46.

Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R. 2004.Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of

reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*; 62(3-4):690-701.

Gadea J, García-Vazquez F, Matas C, Gardon J C, Canovas S, Gumbao D. 2005. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function, *Journal of Andrology* 26, 396-404.

Hernandez-Matos Y, Delgado-Roche L, Lopez Perez R, Martinez-Sanchez G, Mallok A. 2010. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de endocrinología y nutrición*; 18(3):153-158.

Hicks J J, Torres R Y, Sierra V M. 2006 Estrés oxidante. Concepto y clasificación *Revista de Endocrinología y Nutrición*; 14(4): 223-226.

Jerlick A, Pitt AR, Schaur R J, Spickett C M. 2000. Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med*; 28(5):673-82.

Kirchhoff C. 1998. Molecular characterization of epididymal proteins. *Reviews of Reproduction* 3; 86-95.

Lasso J L, Noiles E E, Alvarez JG, Storey B T. 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology*; 15 (3):255–65.

Mallok A, Flores-Sánchez R M, Alonso-Rodríguez C A, Martínez-Sánchez G. 2011. Desbalance redox en la infertilidad masculina. *Revista Cubana de Farmacia*; 45(2):283-296.

Marco-Jimenez F, Lavara R, Vicente J S, Viudes-de-Castro M P. 2006. Cryopreservation of rabbit spermatozoa with freezing media supplemented with reduced and oxidized glutathione. *Cryo Letters*; 27(4):261–8.

Membrillo O A, Córdova, I A, Hicks G J J, Olivares C I M, Martínez T V M, Valencia M J J. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia*. 28(12):699-704.

Mukhtar H, Lee IP, Glutathione Bend JR. 1978. S-transferase activities in rat and mouse sperm and human semen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 83(3):1093–8.

O’Connell M, Mclure N, Lewis S. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human reproduction*; 17 (3): 704-709.

Organización Mundial de la Salud (OMS).

Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. 1994. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril*; 62: 387-393.

Rana K. 1995. Preservation of gametes. En: N. Bromage y R. Roberts (Eds.). *Broodstock management of egg and larval quality*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 53-73.

Renard P y Cochard J. 1989. Effects of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thumberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum* Reeve and king scallop *Pecten maximus* embryos. Influence of the biochemical and effects. *Cryo-Letters*, 10: 169-180.

Reylli P M, Burkley G B. 1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg*; 77:1324-5.

Rooke J A, Shao C C ,Speake B K. 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 121, 315-322.

Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. New Jersey: Wiley-Liss, Hoboken, 2003.

Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*; 41 (3):237–43.

Tremellen K. 2008. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Upd*; 14: 243-258.

- Uysal O, Bucak M.** 2007.Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*; 76 (3):383–90.
- Venereo, G J R.** 2002.Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes.*Rev Cubana Med Milit*; 31(2):126-33.
- Villar-Rojas C, Guzmán-Grenfell A.** 1996.Participation of oxygen-free radicals in the oxide-reduction of proteins. *Arch Med Res.* 27:1-6.
- Villegas J, Schulz M, Soto L, Iglesias T, Miska W, Sánchez R.** 2005.Influence of reactive oxygen species produced by activated leukocytes at the level of apoptosis in mature human spermatozoa.*Fertil Steril*; 83: 808-810.
- Wang A W, Zhang H, Ikemoto I, Anderson D J, Loughlin K R.** 1997.Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*; 49(6):921–5.
- Wang X, Rainwater D, Mahaney M.** 2001.Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*21:1190-1195.
- World Health Organization Laboratory.** 1992. Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, UK.