

*Artículo de Revisión*

## VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MAMÍFEROS

### Vitrification of mammalian spermatozoa

Raúl Sánchez<sup>1\*</sup>, Miguel Mansilla<sup>2</sup>, Jennie Risopatrón<sup>3</sup>, Mabel Schulz<sup>4</sup>, Vladimir Isachenko<sup>5</sup>, Evgenia Isachenko<sup>6</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.41>

<sup>1</sup> Doctor en Medicina, J.L. Universidad de Giessen, CEBIOR-BIOREN, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

<sup>2</sup> Candidato a Doctor, Universidad de La Frontera, Centro de Biomedina-BIOREN, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>3</sup> Magister en Ciencias con mención en Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile, CEBIOR-BIOREN, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>4</sup> Magister en Ciencias con mención Biología de la Reproducción, Universidad de La Frontera, CEBIOR-BIOREN, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

<sup>5</sup> Ph.D., University of Ucraina, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.

<sup>6</sup> Ph.D., University of Ucraina, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.

#### RESUMEN

La criopreservación de espermatozoides y su utilización en inseminación artificial ha causado gran impacto sobre la reproducción de especies comerciales y en humanos. Sin embargo, a pesar del gran avance en el tema, constantemente se modifican los procedimientos de congelamiento, a fin de obtener mejores resultados de viabilidad y movilidad espermática, para lograr de esta forma mayores porcentajes de fecundaciones exitosas. No obstante, el proceso de criopreservación induce pérdida de la función espermática que se refleja en alteraciones de la membrana plasmática, daño a nivel mitocondrial, deterioro en la integridad del ADN, aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y alteraciones del citoesqueleto, lo que finalmente tiene efectos negativos en la viabilidad y motilidad espermática, elementos esenciales para la fecundación. En la búsqueda de métodos que induzcan el menor daño celular, es que ha desarrollado en los últimos años los métodos de vitrificación espermática. Estos han permitido no solo superar en cuanto a la mantención de la función espermática a los métodos convencionales de congelación, sino también que lo hace más rápido, seguro y de menor costo. Esto último al eliminar los equipos necesarios para la congelación lenta y también en algunos casos la no utilización de nitrógeno líquido para el almacenamiento, bastando un congelador de -80°C. Su aplicación en mamíferos, ha sido reportada exitosamente en humanos con nacimientos de niños sanos, tanto en técnicas de fecundación in vitro como inseminación intrauterina y recientemente con el nacimiento de los primeros felinos (gatos) con técnicas de inseminación intrauterina.

E-mail: raul.sanchez@ufrontera.cl.

**Palabras clave:** *Vitrificación, espermatozoides*

## INTRODUCCION

El objetivo de la criopreservación de espermatozoides es mantener su viabilidad y funcionalidad a bajas temperaturas (-196 °C) durante largos períodos de tiempo deteniendo los procesos de envejecimiento y degeneración celular. Las dificultades de la congelación derivan de los procesos de enfriamiento y calentamiento, y no de la permanencia a bajas temperaturas, puesto que a éstas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo reacciones químicas. Los movimientos de agua y de solutos a través de la membrana del espermatozoide vienen determinados por el tamaño celular (área de membrana disponible para intercambiar agua con el medio exterior) y su permeabilidad (a menos temperatura menor permeabilidad y mayor probabilidad de formación de hielo intracelular) (Jiménez *et al.*, 2011).

El daño que se produce durante la criopreservación afecta principalmente a la membrana celular, pero también organelos u otras estructuras intracelulares como mitocondrias, microtúbulos e incluso el núcleo y la cromatina (Rana, 1995). Al respecto, en espermatozoides humanos el hielo intracelular se forma a una velocidad de enfriamiento de 1000 °C/min, no obstante la motilidad comienza a decrecer utilizando tasas de 100 °C/min, lo cual se debería principalmente a formación de cristales de hielo dentro de las mitocondrias; además de lesiones en lisosomas, microtúbulos y microfilamentos (Mazur, 1996). Por tanto, el parámetro crítico en cualquier protocolo de congelación de semen es la velocidad de enfriamiento.

Las células poseen velocidades de enfriamiento óptimas donde los daños producidos son mínimos: a velocidades de enfriamiento lentas se produce daño celular por deshidratación debida a la elevada concentración de solutos en el medio extracelular mientras que a velocidades de enfriamiento elevadas el daño es producido por la formación de hielo intracelular. Esto hace que cada célula requiera un protocolo optimizado según sus prioridades biofísicas.

Durante la descongelación se producen cambios osmóticos inversos a los de la congelación. Las velocidades de calentamiento lentas ocasionan cristalización, por lo que son necesarias velocidades de recalentamiento rápidas para minimizar los daños.

La criopreservación implica el enfriamiento lento o rápido de la célula en contacto con agentes crioprotectores permeables o impermeables. Los crioprotectores permeables, son sustancias de bajo peso

molecular como Dimetilsulfoxido, Glicerol, Metanol, Polietilenglicol, etc; los cuales poseen la característica de ingresar al citoplasma celular deshidratándolo (Miyake *et al.*, 1993). Los crioprotectores impermeables por otro lado, son sustancias que por su mayor tamaño no pueden ingresar al citoplasma, pero actúan extrayendo el agua libre intracelular, apoyados en la diferencia de presión osmótica que producen en el medio intra y extracelular. Entre los más usados se encuentran Polivinilpirrolidona (PVP), Glucosa, Fructosa, Sacarosa, etc. En general la efectividad de los agentes crioprotectores, radica en preservar la funcionalidad y estructura de la célula, manejando el material acuoso que esta posee (Celestinos y Gatica, 2002).

Actualmente la criopreservación lenta o tradicional ha sido la más utilizada, y consiste en el enfriamiento gradual del material y su posterior congelamiento. En el procedimiento se debe mantener un delicado balance, considerando factores como las temperaturas de enfriamiento y descongelamiento, volumen a congelar, crioprotector utilizado, etc., los cuales de no ser regulados pueden producir daño celular irreparable (Mohammad *et al.*, 1997; Albarracín, 2005). En general, se observa que el éxito de criopreservación se encuentra fuertemente asociado a factores específicos de protocolo, entre los que se encuentran concentración adecuada y efecto tóxico de los crioprotectores, temperaturas de congelamiento y descongelamiento, volumen a congelar, composición del medio o temperatura de almacenamiento del material (Devireddy *et al.*, 1999)

### *Criopreservación de espermatozoides*

La criopreservación de espermatozoides y su utilización en inseminación artificial ha causado gran impacto sobre la reproducción de especies comerciales y en humanos. Sin embargo, a pesar del gran avance en el tema, constantemente se modifican los procedimientos de congelación, a fin de obtener mejores resultados de viabilidad y movilidad espermática, para lograr de esta forma mayores porcentajes de fecundaciones exitosas (Stornelli *et al.*, 2005).

En la actualidad, si se comparan indicadores de calidad de espermatozoides congelados y sin congelar, se observan diferencias evidentes en la viabilidad, motilidad y fisiología espermática, elementos que en conjunto hacen difícil la utilización de éstos, en gran parte de las especies de mamíferos, tanto en inseminación intrauterina como en técnicas de reproducción asistida o con el fin de preservar especies comerciales en forma masiva (Purdy y Graham, 2004; McCallum, 2005; Paniagua-Chávez *et al.*, 2006; Luvoni, 2006; Ricker *et al.*, 2006; Fernández *et al.*,

2007). Entre las lesiones espermáticas producidas por congelación, las más recurrentes son: alteraciones de la membrana plasmática, daño a nivel mitocondrial, deterioro en la integridad del ADN, aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y alteraciones del citoesqueleto, produciendo efectos negativos en la viabilidad y motilidad espermática, funciones espermáticas esenciales para la fecundación (Desrosiers *et al.*, 2006; Ricker *et al.*, 2006; Ngmwtiwong y Kunathikom, 2007; Yildiz, 2007). De ahí, que la aplicación de métodos de congelación ultrarrápida (vitrificación) en espermatozoides debe ser evaluado, debido a que esta técnica permitió la preservación de ovocitos en forma generalizada para diferentes especies de mamíferos y con una amplia aplicación especialmente en técnicas reproductivas (Albarracín, 2005).

#### *Vitrificación*

La vitrificación es un método de criopreservación ultra rápida que consiste en la exposición directa de la célula en nitrógeno líquido o a sus vapores, evitando así la cristalización del agua intracelular (Albarracín, 2005). Uno de los principios en que se basa la vitrificación es que la solución vitrificante, lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. La mezcla al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa de líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre (Fahy, 1984).

Este procedimiento tiene aspectos positivos y negativos al ser comparado con otros tipos de criopreservación. Entre los aspectos negativos se encuentran, el aumento de probabilidad de dañar la célula como respuesta al choque osmótico y toxicidad, producida por las elevadas concentraciones de crioprotectores a las que debe ser expuesta. Las ventajas de la vitrificación, son que se elimina totalmente la formación de cristales de hielo, los cuales producen daño celular durante el congelamiento lento, es un método rápido, en el cual se puede prescindir de equipos sofisticados de alto costo (Isachenko *et al.*, 2003). Actualmente, la mayoría de las investigaciones de vitrificación están dirigidos hacia ovocitos y embriones en etapas primarias de segmentación (Kuleshova *et al.*, 1999; Rho *et al.*, 2002; Kuwayama *et al.*, 2005).

Los primeros ensayos de vitrificación realizados en espermatozoides no resultaron exitosos debido a la poca tolerancia de estos a las altas concentraciones de crioprotector (Isachenko *et al.*, 2003). Usualmente, se han utilizado crioprotectores permeables en altas concentraciones para vitrificar espermatozoides. El problema de éstos solventes, especialmente los permeables, radica en que la mayoría tienen carácter tóxico, produciendo daño osmótico a las células,

deterioro que se agudiza, considerando las características de tamaño y escaso citoplasma con el que cuentan los espermatozoides (Isachenko *et al.*, 2004).

El protocolo de vitrificación que utiliza nuestro grupo de trabajo no considera crioprotectores permeables, sino uno impermeable en bajas concentraciones (sucrosa), es más inocuo y disminuye el daño celular al momento de la criopreservación. Esto ha permitido vitrificar espermatozoides por aplicación directa de la solución espermática dentro de nitrógeno líquido (directly plunging), sin la presencia de crioprotectores permeables (Isachenko *et al.*, 2004). Este método nos ha permitido obtener porcentajes de viabilidad y movilidad óptimos, como también bajos porcentajes de fragmentación de ADN, lo que posibilita el uso de estos espermatozoides en reproducción asistida. La vitrificación es más exitosa en espermatozoides debido a su escaso citoplasma, lo que implica menor probabilidad de formación de cristales intracelulares. Por otro lado, las características del citoplasma espermático hacen a este mucho más vulnerable a los crioprotectores permeables, a diferencia de otras células de mayor tamaño como aquellas de tejidos embrionarios u ovocitos (Nawroth *et al.*, 2002; Isachenko *et al.*, 2004).

#### *Bases Físico-Químicas de la Vitrificación*

Durante la preservación a baja temperatura de sistemas biológicos, rara vez se conseguirán verdaderas condiciones de equilibrio. Por debajo de temperaturas de -130 °C, cualquier líquido que permanezca sin congelar entre los cristales de hielo pasa a una transición de vidrio. Las moléculas se pegan unas a otras mediante uniones de hidrógeno débiles. La ventaja que ofrece el aumento en las tasas de enfriamiento y calentamiento es la posibilidad de usar una menor cantidad de crioprotector, disminuyendo así tanto el daño tóxico como osmótico; y proporciona que el paso por las zonas peligrosas de temperatura (de 15 °C a -5 °C) sea rápido y se disminuya el daño de chilling (daño por enfriamiento). Este aspecto es muy importante para las estructuras sensibles, especialmente las que tienen alto contenido en lípidos, como son las membranas (Karlsonn, 2001).

La probabilidad que se formen cristales de hielo grandes o pequeños depende de la velocidad con que el agua fluya a través de la membrana celular, cumpliendo la tasa de congelamiento un rol importante en ello (Mazur, 1984). Pero a la vez, los procesos de ósmosis ocasionados por los cambios de potencial químico (generados por la formación de hielo) dependen de la permeabilidad de la membrana celular. Por lo tanto, la tasa de congelamiento óptima para un

determinado tipo de célula varía de acuerdo a la permeabilidad que tenga la membrana celular al agua y al crioprotector utilizado. El aumento en las tasas de enfriamiento y calentamiento se puede alterar de tres maneras: minimizando la solución alrededor del material, minimizando el aislante térmico (contacto directo entre N<sub>2</sub> y el crioprotector), y evitar la formación de vapor de N<sub>2</sub>. De ahí que la vitrificación cumple con estos parámetros, menor volumen, contacto directo con el nitrógeno líquido y no formación de vapores, eso conlleva a que se forme una mayor cantidad de centros de nucleación, formándose sólo cristales de hielo muy pequeños, tanto intra como extracelulares (Zachariassen y Kristiansen, 2000).

#### Variables en la Vitrificación

Los dos parámetros más importantes para el éxito de la criopreservación y también para la vitrificación, tienen un impacto en la muestra biológica que se enfría desde la temperatura fisiológica hasta la temperatura del nitrógeno líquido, éstos son:

- a) Velocidad de congelación (velocidad de enfriamiento)
- b) Los efectos de las sustancias disueltas (concentración de los crioprotectores)

Existe un límite práctico a la velocidad de enfriamiento alcanzable, como también un límite biológico de la concentración de crioprotector tolerado por las células durante la vitrificación. Por lo tanto, un equilibrio entre la maximización de la velocidad de enfriamiento y la reducción al mínimo de la concentración de crioprotector es importante. La tasa de enfriamiento óptimo es la que permite el movimiento de la mayor cantidad de agua fuera de la célula para que se congele/vitrifique en el espacio extracelular. Por lo tanto, una estrategia principal de cualquier protocolo de vitrificación debe pasar rápidamente a través de la zona de temperatura crítica de 15 a -5 °C para disminuir las lesiones por frío (Cengiz *et al.*, 2007).

El nitrógeno líquido a -196 °C (punto de vaporización) está en el punto de ebullición. Como las células se sumergen, el nitrógeno líquido se calienta y esto induce una extensa ebullición (de modo que se produce gas nitrógeno). En este punto, la evaporización se produce, y una capa de vapor se forma alrededor de las células. Como resultado, el vapor que rodea las células puede crear un aislamiento eficaz que reduce la transferencia de temperatura, y esto resulta en una disminución de la velocidad de enfriamiento (Nijs y Ombelet, 2001). Sin embargo, para lograr mayores velocidades de enfriamiento, es mejor transferir el calor a través de líquido en lugar de vapor, ya que la transferencia de calor por conducción en un líquido es mucho más

rápida que en el vapor. De ahí la importancia en la vitrificación en no usar previamente vapores de nitrógeno sino de inmediato colocar las células a preservar desde temperatura ambiente en contacto con el nitrógeno líquido.

#### Tipos de Vitrificación Espermática

##### Vitrificación no aséptica

Esta es la primera técnica que logra niveles adecuados de conservación de la función espermática en humanos y que aplica la regla básica de este método, que es el contacto directo de las células con el nitrógeno líquido. Lo interesante de esta metodología es que permite conservar espermatozoides libre del plasma seminal, permitiendo eliminar detritus celulares, bacterias, virus y otros elementos que son fuente de ROS y que dañan la membrana del espermatozoide, como son células muertas o leucocitos. Una vez realizada la selección espermática, las células son resuspendidas en medio HTF con 1% de albumina sérica humana (HSA) y sucrosa 0.25M, que se prepara adicionando en relación volumen/volumen 1:1, 0.5 M de sucrosa disuelta en agua bidestilada a una solución de HTF con 2% HSA. Se deja equilibrar la solución durante 5 min, y con una pipeta graduada se preparan alícuotas de 30 µl de solución espermática y son agregadas directamente en nitrógeno líquido formándose esferas sólidas (Figura 1). Las esferas congeladas son depositadas en criotubos rotulados y almacenadas a -196°C en nitrógeno líquido.

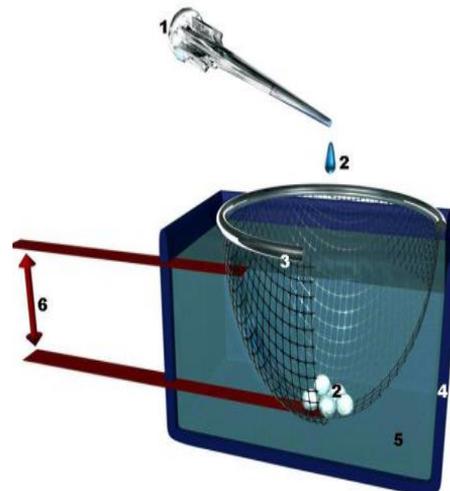


Figura 1. Método de vitrificación no aséptica. 1. Pipetas con volumen ajustable (30µL); 2. Suspensión de espermatozoides; 3. Rejilla; 4. Caja de la espuma; 5. Nitrógeno líquido; 6. Distancia mínima de 3 cm.

El proceso de des-vitrificación se realiza en tubos Falcon conteniendo 5 ml de HTF-HSA 1% a 37°C, depositándose las esferas de material congelado,

agitando con vortex el tubo cada vez que una esfera es depositada dentro de éste. Se debe desvitrificar no más de 5 esferas por tubo para evitar el enfriamiento del medio. Este método permitió obtener una concentración adecuada de espermatozoides con función espermática conservada (figura 2), pero que no puede utilizarse en humanos por no ser aséptico. Sin embargo, genera la posibilidad de aplicarlo en otras especies de mamíferos (Isachenko *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2010; Berrios y Sanchez, 2011).

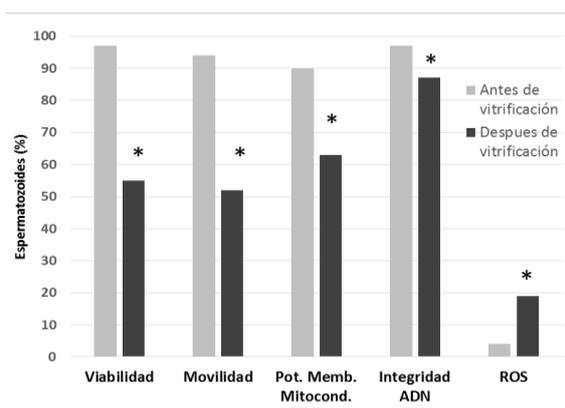


Figura 2. Resultados de los parámetros de función espermática en espermatozoides humanos pre y post-vitrificación no aséptica, obteniéndose una adecuada recuperación de espermatozoides con función preservada.

Esta metodología evaluada en caninos demostró una adecuada mantención de los parámetros de función espermática. Este estudio de nuestro grupo de trabajo comparo diferentes concentraciones de sucrosa (0,1, 0,25 y 0,4 M) en proporción 1: 1 v/v con fluido tubular humano (HTF) suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) 1%. Los mejores resultados se obtuvieron con sucrosa 0,25 M presentando un alto número espermatozoides móviles ( $42,5 \pm 2,3\%$ ) e igualmente la integridad de potencial de membrana mitocondrial ( $42,7 \pm 1,5\%$ ) y baja fragmentación del ADN de los espermatozoides ( $2,8 \pm 0,5\%$ ) (Sánchez *et al.*, 2010). Recientemente, utilizando esta técnica de microesferas de 30 $\mu$ l directamente en nitrógeno líquido, el zoológico de Cincinnati en Estados Unidos reporta el nacimiento de los primeros mamíferos no humanos, 2 gatos, a través de inseminación intrauterina, generando la posibilidad de usar esta metodología en otros animales, especialmente en especies en vías de extinción por la alta conservación de la función espermática, su simpleza, rapidez y bajo costo (<http://cincinnatizoo.org/blog/2015/05/11/glass-glass-baby-breakthrough-in-cryopreservation-technique-produces-kittens-at-cincinnati-zoos-center-for-conservation-research-of-endangered-wildlife-crew/>).

### Vitrificación aséptica

Debido a los riesgos de contaminación microbiológica que presenta el nitrógeno líquido no aséptico, es que se desarrollaron métodos que permiten que el medio con espermatozoides no entre en contacto directo con el nitrógeno. Los más utilizados son aquellos que utilizan pajuelas, ya sea única o bien una pajuela dentro de otra (Isachenko *et al.*, 2011). Además, en estudios previos utilizando esta técnica, demostramos que la vitrificación aséptica, utilizando sucrosa 0.25 M como crioprotector no permeable, se obtenía una adecuada protección contra el daño mitocondrial, la inducción de criocapacitación y reacción de acrosoma. Esto nos ha permitido desarrollar el método de vitrificación aséptica mediante la utilización de pajuelas selladas y expuestas directamente al Nitrógeno líquido. La técnica empleada es la siguiente:

Espermatozoides seleccionados (swim up o percoll) y resuspendidos en HTF-BSA1%-Sucrosa 0,25M, se colocan 100 $\mu$ l de solución ( $1.5 \times 10^6$  espermatozoides) en pajuelas de 0.25ml y se introduce en otra pajuela de 0.5ml que es sellada con calor (Figura 4). Posteriormente, se sumergen las pajuelas en N<sub>2</sub>L por 5 segundos, se guardan en el porta pajuelas y se pueden almacenar ya sea en N<sub>2</sub>L como en freezer a -80°C para su conservación (Sánchez *et al.*, 2012). Esta técnica mejora en forma ostensible la función espermática en comparación con la congelación lenta, la movilidad espermática luego de la desvitrificación fue de un 77,6 % con un Potencial de Membrana Mitocondrial de 71,7% significativamente superior a la congelación con un 28,6 % y 29,5 % respectivamente. Estas diferencias también se encontraron en la protección de la membrana plasmática, aunque todavía persiste una disminución respecto al control, este fue de 77,2 % y disminuyó en la vitrificación a 54,3%. Pero sólo el 21,2 % de los espermatozoides presentaron integra la membrana plasmática con la congelación lenta. La Integridad de Membrana Acrosomal presento menor daño en los espermatozoides vitrificados comparados con la congelación tradicional ( $28,0 \pm 6,9\%$  v/s  $41,4 \pm 2,5\%$ ) ( $p < 0,05$ ). En los aspectos más clásicos del daño al espermatozoide como es la inducción de una prematura capacitación o criocapacitación evaluado por la translocación de la Fosfatidilserina, es donde más intensamente evita este fenómeno la vitrificación, con un 1,6% de los espermatozoides, valor similar al control, pero la congelación lenta no evita este fenómeno con 20,1% de los espermatozoides con marcación positiva. En forma similar a estudios previos no se observó aumento en la Fragmentación de ADN de los espermatozoides en ninguno de los métodos de criopreservación.

Al aplicar los diferentes modelos de preservación del gameto masculino, continúa siendo la movilidad, uno de los indicadores que se ve más severamente afectado, y es el que en muchas especies de mamíferos mejor se correlaciona con el éxito evaluado a través de la preñez. En ambas técnicas de vitrificación se obtuvo un porcentaje importante de espermatozoides vivos con movimiento progresivo (59.4% vitrificación no aséptica y 77,6 % vitrificación aséptica).

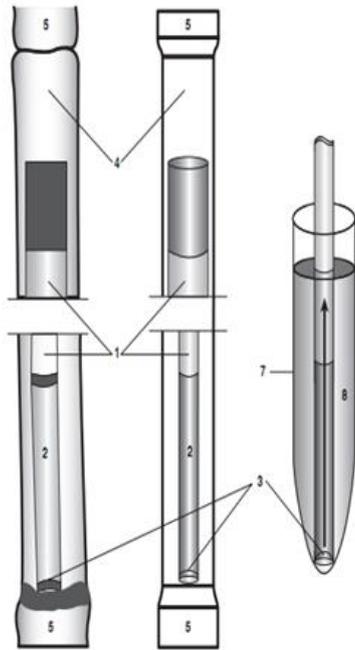


Figura 4. Método de vitrificación aséptica. 1. Pajuela Interna de 0.25 ml, llenada con 100µL de medio; 2. Suspensión de espermatozoides; 3. Menisco de suspensión; 4. Pajuela de 0.5 ml; 5. Sellado con calor; 6. Marca sobre la pajuela; 7. Tubo para descongelar; 8. Medio de descongelación.

#### *Desvitrificación Espermática*

El proceso de desvitrificación de la solución intracelular puede causar un daño significativo durante el calentamiento de las células criopreservadas por congelación o vitrificación. Cuando se congela una suspensión de células, se forma hielo primero en el medio extracelular, que agota gradualmente la suspensión no congelada restante de agua. Simultáneamente, durante el enfriamiento, las células se deshidratan debido a las fuerzas osmóticas resultantes de la concentración por congelación de solutos extracelulares. Para velocidades de enfriamiento casi óptimas, la solución intracelular se solidificará en un estado total o parcialmente vítreo, pero, posteriormente debe volverse a una solución acuosa, en este proceso hay varios mecanismos potenciales de daño celular.

Durante el calentamiento desde el estado congelado, la criolisis causada durante el calentamiento se cree que resulta en parte de la desvitrificación de la solución intracelular, con la formación de nuevos núcleos de hielo o crecimiento de los cristales existentes en el citosol al ablandamiento de la matriz vítreo de la célula solidificada (Karlsson, 2001). El crecimiento de los cristales de hielo no termina con el congelamiento. Cuando empieza el descongelamiento puede ocurrir la recrystalización, agregándose más moléculas de agua a los microcristales ya formados; pero esto ocurre sólo dentro de cierto rango de temperatura, que es entre -15 y -60°C (Mazur, 1984) o entre -10 y -20°C (Roqueber y Bury, 1993).

A bajas tasas de calentamiento, la cristalización es completa, ya que existe un tiempo promedio en el cual se produce un movimiento de moléculas de agua u otros solutos, facilitando la formación de cristales de hielo, de forma intra y extracelular. En todos los tipos de calentamiento de menos de 1000 °C/min, se formará hielo porque permite que se adhieran moléculas a los núcleos de cristales en formación, por temas de difusión en la membrana, ocasionando daño en las estructuras celulares. Por otra parte, este fenómeno se reduce significativamente al aumentar la tasa de calentamiento o desvitrificación. De ahí que es crítica la temperatura a la cual se produce la desvitrificación. En estudios previos demostramos que el daño de la membrana acrosomal estaba directamente asociada al estado de la membrana plasmática postvitrificación (Berrios y Sánchez, 2011), experimentando un conjunto de alteraciones estructurales y funcionales irreversibles, como la fluidez y reducción en la difusión de algunos lípidos, no obstante aunque la funcionalidad de la membrana este severamente alterada, las células se observan sin daño aparente (James *et al.*, 1999).

El proceso de desvitrificación utilizado es similar a la vitrificación no aséptica, las pajuelas son cortadas en uno de sus extremos y colocadas hasta tres pajuelas en un tubo Falcon conteniendo 5ml de HTF+BSA 1% a 37°C (en baño maría) para evitar que el medio se enfríe. Luego se equilibra la solución conteniendo los espermatozoides por 5 minutos a 37°C en estufa de cultivo, se realiza una centrifugación a 1800 rpm por 5 minutos y posteriormente se resuspenden los espermatozoides en el volumen deseado según el uso final de la muestra. Este método aunque mantenía una buena motilidad persistía el daño a nivel de membrana cercano al 30% de los espermatozoides. Como el proceso de desvitrificación incrementa la producción de ROS y este está asociado a lipoperoxidación y daño de membranas celulares (Berrios y Sánchez, 2011), se utilizó como antioxidante un análogo sintético de la vitamina E, el Butylhydroxitoluene (BHT) para determinar

su efecto crio-protector sobre espermatozoides humanos, no lográndose disminuir el daño de membrana (Merino *et al.*, 2015).

Nuestros últimos estudios se dirigieron a incrementar la velocidad de desvitrificación, aumentando la temperatura del medio desde 38 °C, 40°C y 42 °C, evaluando motilidad por el sistema de CASA y la función de la membrana de espermatozoides mediante la prueba de HOST. Se detectó que la motilidad progresiva de los espermatozoides a 38 °C, 40 °C y 42 °C fue de 26,4 ± 8,4%; 56,6 ± 16,3% y 65,4 ± 15%, respectivamente. La función de la membrana plasmática evaluadas por la prueba HOST se conservó mejor a 42 °C (76,3 ± 2,0%) en comparación con 40 °C (43 ± 2%) y 38 °C (65,6 ± 1,5%). Por tanto, la temperatura en el proceso de descongelación en espermatozoides vitrificados parece ser un factor crítico para mantener una adecuada motilidad e integridad y función de la membrana, siendo la temperatura óptima de 42 °C para preservar los parámetros fisiológicos de los espermatozoides (Mansilla *et al.*, 2015).

*Almacenamiento de las muestras*

La forma de almacenamiento de las muestras es cada vez más importante, ya que el uso del nitrógeno líquido requiere de grandes espacios, tanto para preservar las muestras como para su manipulación y en especial el uso y almacenamiento de este que no está ajeno a

riesgos, que van desde la quemaduras a asfixias graves. Este conjunto de situaciones hace que el costo de su uso sea elevado y restrinja la incorporación masiva de estas técnicas para la preservación de espermatozoides en mamíferos

Al estar los espermatozoides vitrificados con sustancias no permeables, disminuye la posibilidad de agua dentro de la célula, y hace posible evaluar el almacenaje a temperaturas menores. La evaluación del almacenamiento a -80°C (frezer) y a -196°C (nitrógeno líquido) demostró que los espermatozoides vitrificados conservaron intacta su función evaluados a través de la motilidad, potencial de membrana mitocondrial y fragmentación del ADN en ambas temperaturas (Tabla 1).

Tabla 1. Función espermática posterior a la desvitrificación en almacenamiento a -86 °C o -196 °C Espermatozoides vitrificados

Parámetro	Espermatozoides vitrificados	
	-196°C	-86°C
Motilidad progresiva (%)	77,0 ± 2,5	73,8 ± 2,4
ΔΨm Intacto (%)	74,6±1,6	71,7±1,7
Fragmentación del ADN (%)	2,9± 0,8	3,1± 0,6

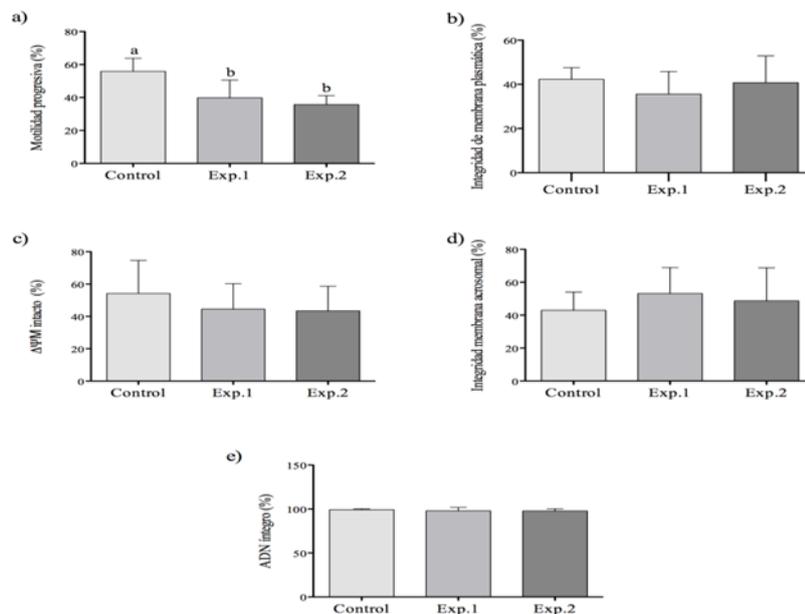


Figura 3. Población de espermatozoides caninos postdescongelación analizados por citometría de flujo. Control: congelación y almacenado en N2L; Exp.1: congelación y almacenado a -80°C. Exp.2: congelación a -80°C y almacenado en N2L. a) Motilidad progresiva; b) Espermatozoides viables con membrana plasmática intacta, tinción SYBR-14/PI, c) espermatozoides con ΔΨm intacto, tinción fluorescente JC-1; d) Espermatozoides viables con membrana acrosomal intacta, tinción fluorescente FITC-PSA/PI; e) Espermatozoides con ADN íntegro, tinción TUNEL.

Esto simplificará a futuro el almacenamiento de muestras, reduciendo el espacio, un menor tiempo y esfuerzo para encontrarlas y más seguro para el operador (quemaduras, derrames de nitrógeno líquido cuando se recarga, entre otros). Esto conlleva a una disminución de los costos especialmente para ser utilizados en centros dedicados a la preservación o mejoramiento genético de diferentes mamíferos y también en humanos que desean preservar su fertilidad y/o en pacientes con oligoastenozoospermia que deben tener un mínimo de espermatozoides motiles para que las inseminaciones intrauterinas sean efectivas, otorgándole así una posibilidad terapéutica de bajo costo antes de iniciar directamente un tratamiento de ICSI. Esta técnica de vitrificación con una alta conservación de la función espermática, ha generado los primeros embarazos por inseminación intrauterina de paciente con oligoastenozoospermia severa y reportándose en el año 2012 los primeros nacidos vivos a nivel mundial (Sánchez *et al.*, 2012). Asimismo, se estudió en caninos la congelación y almacenamiento de espermatozoides en pajuela a  $-80^{\circ}\text{C}$  y en nitrógeno líquido, y como se observa en la Figura 3 no existe diferencia en los parámetros de función espermática evaluados (Salinas *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

La vitrificación es un método que conserva íntegra la funcionalidad espermática, obteniéndose un alto porcentaje de espermatozoides motiles que conservan la función mitocondrial y ADN intactos.

La vitrificación protege al espermatozoide de la criocapacitación, no modificando el porcentaje de espermatozoides con translocación de fosfatidilserina previo a la crioconservación.

La vitrificación es una técnica metodológicamente simple de implementar y menos laboriosa que la congelación. Se suma a ello la utilización de pajuelas selladas que evitan el contacto de los espermatozoides con el nitrógeno líquido, por lo cual es una técnica completamente aséptica.

El gameto libre de plasma seminal con función conservada puede ser utilizado de inmediato para cualquier técnica reproductiva, minimizando los daños generados por la centrifugación y las horas de cultivo, ambos procesos dañinos para la célula, ya que producen una alta concentración de ROS y posible daño al ADN. Generando un nuevo concepto que es el cambio de los bancos de semen a bancos de espermatozoides.

La temperatura óptima para el proceso de desvitrificación es  $42^{\circ}\text{C}$  que conlleva a una disminución de daño de membrana plasmática y acrosomal.

Los espermatozoides vitrificados conservan su función a temperaturas de  $-86^{\circ}\text{C}$ , esto simplifica el almacenamiento de muestras, reduciendo el espacio, un menor tiempo y esfuerzo para encontrar las muestras almacenadas y más seguro para el operador (quemaduras, derrames de nitrógeno líquido cuando se recarga, entre otros).

La no utilización de equipamiento para una congelación gradual y el poco tiempo para su realización conlleva a una disminución de los costos, especialmente para centros dedicados a la preservación y mejoramiento genético en mamíferos y personas que desean preservar su fertilidad y en los pacientes con oligoastenozoospermia que les permite ir colectando muestras para los ciclos de IUI, antes de iniciar directamente una ICSI.

## Agradecimientos:

Parte de la investigación fue financiada por el Proyecto CORFO-CEGIN N° 09CN14-5960, Gobierno de Chile.

## REFERENCIAS

- Albarracín L. Vitrificación de ovocitos bovino mediante la técnica open pulled straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in Vitro. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria Universidad Autónoma de Barcelona. España. 2005.
- Berrios O, Sánchez R. Congelación ultra rápida en espermatozoides humanos: Efecto sobre la función espermática y producción de especies reactiva de oxígeno. *International Journal of Morphology*, 2011; 29: 899-906
- Roquebert MF, Bury E. Effect of freezing and thawing on cell membranes of *Lentinus edodes*, the shiitake mushroom. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1993; 9: 641-647
- Celestinos M, Gatica R. Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos Medicina Veterinaria* 2002; 34: 157-165
- Cengiz Y, Ottaviani P, Law N, Ayeart R, Liu L, McKerlie C. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction* 2007;133: 585-595
- Desrosiers P, Légaré G, Leclerc P, Sullivan R. membranous and structural damage that occur during

- cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertility and Sterility* 2006; 6:1744-52
- Devireddy R, Swanlund K, Roberts K, Bischof J. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. *Biology of Reproduction* 1999; 61: 764-775.
- Fahy G, Mac Farlane D, Angell C, Meryman H. Vitrification as an approach to cryoconservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-426.
  - Isachenko V, Alabart J, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both?. *Cryo Letters* 2001; 22: 157-162
  - Isachenko E, Isachenko V, Katkov I, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online* 2003; 6: 191-200
  - Isachenko E, Isachenko V, Katkov I, Rahimi G, Schöndorf t, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction* 2004; 19: 932-939
  - Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Lulat AG, Schulz M, Risopatrón J, Weiss J, Sánchez R. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* 2008; 136: 167-173.
  - Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Mallmann, P, Rahimi G, Sterzik K, Sanchez R, Risopatrón J, Damjanoski I, Isachenko E. Cryoprotectant-Free Vitrification of Human Spermatozoa in Large (to 0.5 ml) Volume: Novel Technology. *Clinical Laboratory*. 2011; 57: 643-650
  - James P, Wolfe C, Makie C. Lipids dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Human Reproduction* 1999; 14: 1827-1838
  - Jiménez MI, Serrano MG, Moreno JM. Técnicas de Criopreservación Seminal. Documento D. Fase 3. Versión 3. España. 2011.
  - Karlsson JO. A theoretical model of intracellular devitrification. *Cryobiology*. 2001; 42, 154-169
  - Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Human Reproduction* 1999; 14: 3077-3079
  - Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; 11: 300-308
  - Luvoni G. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006; 66: 101-111
  - MacCallum C, Johnston S. Studies on the cryopreservation of common wombat (*Vombatus ursinus*) spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 2005; 7: 727-732
  - Mansilla MA, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Isachenko E, Sánchez R. High temperature is essential for preserved human sperm function during the devitrification process. *Andrologia*. 2015; doi: 10.1111/and.12406
  - Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology* 1984; 247: C1125-1142
  - Merino O, Aguagüña WE, Esponda P, Risopatrón J, Isachenko E, Isachenko V, Sánchez R. Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique. *Andrologia*. 2015; 47: 186-93
  - Miyake T, Kasai M, Zhu E, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993; 40: 121-134
  - Mohammad S, Barratt C, Cooke I, Moore H. Continuous assessment of human spermatozoa viability during cryopreservation. *Journal of Andrology* 1997; 1: 43-50
  - Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, Mallmann P, Dattena M, Capobianco G, Peters D, Orth I, Isachenko E. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectant. *Cryoletters* 2002; 23; 93-102
  - Nijs M, Ombelet W. Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility* 2001; 4: 158-163.
  - Ngmwtiwong T, Kunathikom S. Evaluation of cryoinjury of sperm chromatin according to liquid nitrogen vapour method (I). *Journal of the Medical Association of Thailand* 2007; 90: 224-228.
  - Paniagua-Chávez C, Jenkins J, Segovia M, Tiersch T. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology* 2006; 1: 128-138
  - Purdy P, Graham J. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reproduction* 2004; 2: 522-527
  - Rana KJ. Cryopreservation of fish spermatozoa. *Methods of Molecular Biology* 1995; 38: 151-165
  - Ricker J, Linfor J, Delfino W, Kysar P, Scholtz E, Tablin F, Crowe J, Meyers S. Equine sperm membrane phase behavior: The effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction* 2006; 74: 359-365
  - Rho G, Kim S, Yoo J, Balasubramanian S, Lee H, Choe S. Microtubulin configuration and

mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 4: 464-470

- Salinas P, Sánchez R, Risopatrón J. Criopreservación de Espermatozoides Caninos a -80°C. *International Journal Morphology* 2013; 3: 217-224
- Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas J, Kreienberg R, Isachenko V, Isachenko E. Canine sperm vitrification with sucrose: Effect on sperm function. *Andrologia* 2010; 43:114-120.
- Sanchez R, Risopatron J, Schulz M, Villegas J, Isachenko V, Isachenko E. Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86°C. *Andrologia*. 2012; 44: 433-435
- Stornelli M, Tittarelli C, Savignone C, Stornelli M. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria* 2005; 25 28-35
- Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L, McKerlie C. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction* 2007; 3: 585-595
- Zachariassen KE, Kristiansen E. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* 2000; 41: 257-279