

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto antioxidante del Butilhidroxitolueno sobre la
función espermática en semen humano
criopreservado mediante la técnica de vitrificación

Tesis para optar el Título Profesional de
Licenciada en Biología

María Claudia Sandoval Angeles

Asesor: Mg. H. Mauricio Gonzales Molfino

Lima, Perú
2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por permitirme haber llegado a este momento tan importante de mi formación profesional. A mi abuela, Margarita Fernández, por todo el ánimo que me brindaste siempre a lo largo de la carrera, pues a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre y, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí. A mi madre Beatris Angeles y a mi padre Jorge Corbacho, por ser el pilar más importante de mi vida, por demostrarme siempre su amor y cariño, e impulsándome a ser mejor cada día. A mis hermanos, Jorge y Maria Fernanda, por estar siempre presentes y acompañándome en este proceso. Finalmente, a Carlitos Sánchez, por estar a mi lado brindándome su apoyo incondicional.

Maria Claudia Sandoval Angeles.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mi asesor y director de tesis, Mg. H. Mauricio Gonzales, que gracias a sus consejos y correcciones hoy puedo culminar este trabajo. A todas las personas que de una manera u otra influyeron en mí dándome un consejo y apoyo para concluir esta tesis, especialmente a mi tío Manuel Sandoval, por su paciencia y soporte en su elaboración. A todos mis amigos, los cuales me ayudaron de manera desinteresada, gracias infinitas por toda su cooperación y buena voluntad durante el proceso. Este trabajo se ha realizado con financiamiento de recursos propios en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

Maria Claudia Sandoval Angeles

RESUMEN

La siguiente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antioxidante del Butilhidroxitolueno (BHT) sobre la función espermática en semen humano criopreservado mediante la técnica de vitrificación. Se seleccionaron 20 muestras de donantes normozoospermicos los cuales se capacitaron por el método de gradiente de densidad obteniendo un pellet el cual se llevó a una concentración de 5×10^6 con Fluido Tubárico Humano (HTF) más Albúmina Sérica Humana (HSA) al 1%, la media de la Motilidad Progresiva en la muestras capacitadas fue de $90.45\% \pm 2.0$, una media Vitalidad de $91.75\% \pm 1.92$ y un índice de fragmentación de ADN (IDF) menor a 22%. El medio de vitrificación usado para el control fue HTF suplementado con HSA al 1%/ + 0.25 mol/L de sucrosa (1:1) Los tratamientos fueron T1: 0.5mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25 mol/L de sucrosa, T2: 1mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25 mol/L de sucrosa, T3: 1.5mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25 mol/L de sucrosa y T4: 2mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25 mol/L de sucrosa; los cuales se mezclaron con el capacitado e incorporado en forma de perlas de 30 μ l al nitrógeno líquido, se colocaron en crioviales y fueron almacenados en un tanque de nitrógeno por 24 horas como mínimo. Se analizaron los parámetros seminales para evaluar la efectividad antioxidante del BHT haciendo uso del programa SPSS y analizando la varianza (ANOVA) con grado de confianza ($P < 0.05$). La motilidad espermática fue significativamente mayor en el tratamiento 2 (1mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25 mol/L de sucrosa) que en el resto de tratamientos la cual fue de $60.29\% \pm 4.1$, al igual que en la vitalidad espermática fue de $64.58\% \pm 2.1$, y un índice de fragmentación de ADN (IDF) que disminuyó un 6% respecto a los demás. En conclusión, se deduce que el uso del antioxidante BHT en la solución de vitrificación en la concentración de 1mM serviría en técnicas de criopreservación en reproducción humana para mejorar la calidad seminal post descongelación.

Palabras clave: andrología, vitrificación, butilhidroxitolueno.

ABSTRACT

The objective of the following research was to evaluate the antioxidant effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on sperm function in cryopreserved human semen using the vitrification technique. We selected 20 samples from normozoospermic suppliers who were trained for the density gradient method obtaining a pellet which produced a concentration of 5×10^6 with Human Tubal Fluid (HTF) plus Human Serum Albumin (HSA) at 1%, the average Progressive motility in the trained samples was $90.45\% \pm 2.0$, a mean Vitality of $91.75\% \pm 1.92$ and a DNA fragmentation index (IDF) of less than 22%. The vitrification medium used for the control was HTF supplemented with 1% HSA / 0.25 mol / L sucrose (1: 1) The treatments were T1: BHT 0.5MM + HTF 1% HSA + 0.25 mol / L sucrose, T2: 1 mM BHT + HTF 1% HSA + 0.25 mol / L sucrose, T3: 1.5 mM BHT + HTF 1% HSA + 0.25 mol / L sucrose and T4: 2 mM BHT + HTF HSA 1% + 0.25 mol / L sucrose The energy storage systems were mixed with capacity and incorporated in the form of 30 μ l data into liquid nitrogen, placed in cryovials and stored in a nitrogen tank for 24 hours As minimum. Analyze the variance (ANOVA) with degree of confidence ($P < 0.05$). Sperm motility was significantly higher in treatment 2 (1mM BHT + HTF HSA 1% + 0.25 mol / L of sucrose) than in the rest of the treatments which was $60.29\% \pm 4.1$, as in the sperm vitality was of $64.58\% \pm 2.1$, and a DNA fragmentation index (IDF) that decreased by 6% with respect to the others. In conclusion, it is deduced that the use of the antioxidant BHT in the vitrification solution in the concentration of 1mMería in the techniques of cryopreservation in the reproduction to improve the post-thawing seminal quality.

Key words: andrology, vitrification, butylated hydroxytoluene.

ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTO	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INDICE	6
I. INTRODUCCIÓN	9
II. OBJETIVOS	11
III. MARCO TEÓRICO	12
5.1. Fisiología de la reproducción masculina	12
5.1.1. Testículos	12
5.1.2. Espermatogénesis	12
5.1.3. Transporte del espermatozoide	13
5.1.4. Estructura del espermatozoide	14
5.2. Criopreservación espermática	14
5.2.1. Congelación lenta	14
5.2.2. Vitricación	14
5.3. Crioprotectores	15
5.3.1. Crioprotectores penetrantes	15
5.3.2. Crioprotectores no penetrantes	15
5.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	16
5.4.1. Fragmentación del ADN y EROs	17
5.5. Antioxidantes	19
5.5.1. Butilhidroxitolueno (BHT)	19
IV. ANTECEDENTES	20

	Pág.
V. HIPÓTESIS	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Lugar de ejecución	24
6.2. Tipo y diseño de investigación	24
6.3. Población de estudio	24
6.4. Variables	24
6.5. Operacionalización de las Variables	25
6.6. Muestreo	25
6.7. Determinación de los parámetros seminales en semen fresco	26
6.7.1. Análisis macroscópico de la muestra	26
6.7.2. Análisis microscópico de la muestra	27
6.8. Capacitación espermática en gradiente de densidad	29
6.8.1. Técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD)	30
6.9. Preparación de tratamientos para la vitrificación	31
6.10. Análisis de parámetros seminales post-vitrificación	32
6.11. Análisis estadístico	32
6.12. Aspecto ético	32
XII. RESULTADOS	33
7.1. Determinación de parámetros seminales en semen humano fresco	33
7.1.1. Resultados del análisis seminal en parámetros macroscópicos	
7.1.2. Resultados del análisis seminal en parámetros microscópicos	
7.2. Análisis de parámetros seminales en semen humano capacitado ...	35
7.3. Comparación de la calidad seminal de semen post-vitrificado con tratamientos	35

	Pág.
7.4. Efecto antioxidante del Butilhidroxitolueno en el test de dispersión de la cromatina espermática (SCD)	36
XII. DISCUSIÓN	37
IX. CONCLUSIONES	39
X. RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	47

1. INTRODUCCIÓN

Una tecnología que surge recientemente en el campo de la criobiología reproductiva es la vitrificación, Este método se basa en el enfriamiento rápido de las células por inmersión en nitrógeno líquido y, por lo tanto, es la clave para reducir la posibilidad de formar grandes cristales de hielo. La criopreservación de espermatozoides se ha convertido en una técnica de rutina en el manejo de la infertilidad masculina humana. Introducido en la década de 1960, ha superado muchas limitaciones de espacio y tiempo y ahora es una parte integral de las tecnologías de reproducción asistida. Recientemente, la vitrificación se ha descrito como una técnica alternativa para la criopreservación de espermatozoides.

El mayor problema de la vitrificación es la toxicidad de los medios, dada por las altas concentraciones de crioprotectores permeables (CP) utilizadas. La vitrificación de espermatozoides en ausencia de crioprotectores permeables es un método relativamente nuevo usado con éxito en humanos y caninos. Los crioprotectores utilizado con más frecuencia es el glicerol, DMSO y etilenglicol que debe ser usado a bajas concentraciones (menos del 4%) debido a su potencial de toxicidad y permeabilidad por tal razón, en la actualidad se ha investigado la utilización de otros agentes crioprotectores menos dañinos, tales como los agentes no permeables dentro de estos azúcares como la rafinosa, trehalosa y sacarosa, ya que estos favorecen la excreción de agua fuera de la célula, a fin de disminuir la formación de cristales de hielo intracelular.

La criopreservación de las células reproductivas produce un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la reducción de su capacidad antioxidante, lo cual origina una condición de estrés oxidativo. Las EROs son responsables de causar daño a las membranas de los espermatozoides y de la fragmentación de su ADN, entre otros factores que influyen en la fertilidad. Este induce en las células espermáticas cambios en la fluidez de la membrana y alteración de la actividad enzimática, lo cual genera la reducción de la movilidad, la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides.

El estrés oxidativo está considerado como una de las principales causas de fragmentación del ADN espermático. De modo general, por estrés oxidativo se entiende que, en el órgano afectado, se está produciendo un desequilibrio metabólico, al no ser capaz el organismo de neutralizar rápidamente las especies reactivas de oxígeno que se producen como consecuencia del constante aporte de energía metabólica que necesita para su actividad. De este modo, al acumularse producen daños en todos los componentes de la célula, entre ellos en el ADN, oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y oxidación de aminoácidos en las proteínas.

Diversos estudios han demostrado que las especies reactivas de oxígeno, de origen tanto endógeno como exógeno, pueden inducir la rotura del ADN espermático in vitro o in vivo confirmando el papel que los radicales libres desempeñan en la etiología de la infertilidad masculina.

Dentro de los diferentes antioxidantes, el Butilhidroxitolueno (BHT) es un análogo sintético de la vitamina E, cuyo efecto protector se atribuye a dos mecanismos: el aumento de la fluidez de la membrana plasmática tras la incorporación del antioxidante, y el segundo por contener la cascada peroxidación lipídica por la conversión de peroxil a hidroperóxido lipídico. De esta manera, puede prevenir o reducir los cambios de permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides cuando las células reciben un shock en frío.

El BHT fue probado en esperma de diversas especies de como búfalo, toro y chivo demostraron mejoría en la motilidad, integridad de membrana plasmática, viabilidad espermática y reducción de la fragmentación de ADN. Es por ello que, el objetivo de la presente investigación es determinar el efecto antioxidante del butilhidroxitolueno a cuatro concentraciones: 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM. en el medio de vitrificación a través de espermogramas y la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD), ésta última nos demostrará la capacidad del ADN íntegro de expandirse a modo de halos alrededor de la cabeza del espermatozoide cuando la cromatina no está presente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto antioxidante del Butilhidroxitolueno sobre la función espermática en semen humano criopreservado mediante la técnica de vitrificación

2.2. Objetivos específicos:

- Determinar los parámetros seminales en semen humano fresco.
- Analizar los parámetros seminales en semen humano capacitado.
- Comparar la calidad de semen post-vitrificado en medios con y sin Butilhidroxitolueno.
- Identificar el efecto antioxidante del Butilhidroxitolueno a través de la técnica de la dispersión de la cromatina espermática (SCD).

3. MARCO TEORICO

3.1. Fisiología de la reproducción masculina

Los órganos genitales masculinos comprenden órganos genitales externos: testículos, pene y escroto; órganos genitales internos: vesículas seminales, conductos deferentes y conductos eyaculadores; y glándulas genitales auxiliares: próstata, glándulas bulbouretrales (Gonzales, 1992)

3.1.1. Testículos

Los testículos son dos glándulas ovoides, una a cada lado del pene, de unos 5 cm de largo y 2,5 cm de diámetro y con un peso de 10-15 gramos, que están suspendidas dentro del escroto por el cordón espermático. Producen las células germinales masculinas o espermatozoides y las hormonas sexuales masculinas o andrógenos. Constituyen las gónadas masculinas y tienen el mismo origen embriológico que los ovarios o gónadas femeninas (Griswold, 1995)

En el interior de cada testículo, los espermatozoides se forman en varios cientos de túbulos seminíferos que se unen para formar una red de canales que recibe el nombre de *rete testis*. Pequeños conductos conectan la rete testis con el epidídimo. Los túbulos seminíferos contienen dos tipos de células, las células espermatogénicas, que darán lugar a los espermatozoides y las células de Sertoli encargadas del mantenimiento del proceso de formación de espermatozoides o espermatogénesis. En el tejido conjuntivo situado en los espacios que separan a los túbulos seminíferos adyacentes hay grupos de células llamadas células de Leydig que secretan testosterona, el andrógeno más importante (McAninch y Lue, 2018).

3.1.2. Espermatogénesis:

En la pubertad, las células germinales masculinas situadas en los testículos o gónadas masculinas, se activan y dan lugar al comienzo de la espermatogénesis o formación de los espermatozoides, que son los gametos masculinos. Los gametos son células sexuales especializadas

(espermatozoides y ovocitos) producidas por las gónadas (masculinas y femeninas, respectivamente) que transmiten la información genética entre generaciones. La espermatogénesis o formación de los espermatozoides, tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos en donde se encuentran las células germinales en diversas fases de desarrollo (Gonzales, 1992)

Las células germinales son células indiferenciadas llamadas espermatogonias que se multiplican por mitosis y contienen 46 cromosomas. Cada espermatogonia aumenta de tamaño y se convierte en un espermatocito primario que sigue teniendo 46 cromosomas. Al dividirse el espermatocito primario da lugar a dos espermatocitos secundarios cada uno de los cuales tiene ya 23 cromosomas, es decir, la mitad de la dotación genética de una célula normal. De cada espermatocito secundario se originan dos células hijas llamadas espermátidas que también contienen 23 cromosomas. Por último, se produce la transformación de cada una de las espermátidas en un espermatozoide. Se necesitan unos dos meses para formar un espermatozoide a partir de un espermatocito primario y este proceso solo ocurre a temperaturas inferiores a la del cuerpo humano. Por esta razón los testículos están alojados en el escroto, fuera de la cavidad abdominal (Griswold, 1995)

Cada día, alrededor de 300 millones de espermatozoides completan el proceso de espermatogénesis. En la pared de los tubos seminíferos se encuentran, además, las células de Sertoli que proporcionan un soporte mecánico y metabólico a los espermatozoides y en el tejido conjuntivo situado entre los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig que son las encargadas de secretar la hormona testosterona (McAninch y Lue, 2018).

3.1.3. Transporte del espermatozoide

El transporte del espermatozoide desde que es liberado a la luz tubular hasta que está listo para salir en la eyaculación dura 7 – 10 días. En el espermatozoide testicular ocurren cambios anatómicos, bioquímicos

funcionales conforme pasa por el epidídimo. El epidídimo es un túbulo simple, enrollado sobre sí mismo, que tiene una longitud de 4 – 5 metros divididos en cabeza, cuerpo y cola. En el epidídimo, las contracciones regulares de la pared del conducto parecen proveer la fuerza necesaria para movilizar los espermatozoides. Aunque es reconocido que los espermatozoides del epidídimo (cabeza) carecen de capacidad fertilizante, los recientes estudios de fertilización in vitro han demostrado que esto es incorrecto; lo que sucede es que la capacidad fertilizante aumenta a medida que los espermatozoides progresan de la cabeza a la cola. (Gonzales, 1992)

En el epidídimo los espermatozoides maduran y pueden ser almacenados. La maduración implica una serie de cambios estructurales que conllevan a la adquisición de la motilidad, disminución de la gota citoplasmática en la pieza intermedia, cambios eléctricos en la superficie de la membrana, aumento en el contenido de AMPc, modificación de la forma del acrosoma y adquisición de proteínas de superficie que se creen son factores descapacitantes. (Dohle y col., 2010)

3.1.4. Estructura del espermatozoide

El espermatozoide humano maduro es una célula alargada (de unas 60 micras de largo) y delgada y consiste en una cabeza y una cola. En la cabeza se encuentra el núcleo, que contiene 23 cromosomas, es decir la mitad de la dotación cromosómica completa de una célula normal, con un citoplasma y una membrana citoplasmática muy delgada a su alrededor. Sobre el exterior de los 2/3 anteriores de la cabeza se encuentra un capuchón grueso, el acrosoma, que contiene numerosos enzimas que ayudan al espermatozoide a penetrar en el ovocito secundario y así conseguir la fecundación. La cola es móvil con una gran cantidad de mitocondrias en la parte proximal, y la parte restante es, en realidad, un largo flagelo que contiene microtúbulos con una estructura similar a la de los cilios, que sirven para que el espermatozoide pueda avanzar, lo que realiza por medio de un

movimiento flagelar de la cola a una velocidad de 1-4 mm/min. Una vez producida la eyaculación, la mayoría de espermatozoides no sobreviven más de 48 horas dentro del sistema reproductor femenino (Wein y col., 2015).

3.2. Criopreservación espermática

La criopreservación espermática se difundió en vista de la posibilidad de almacenamiento de semen por períodos largos (refrigeración) o incluso indeterminados (congelación) y por poseer diversas ventajas como la rápida difusión de material genético. Sin embargo, es un proceso que impone a los espermatozoides condiciones extremadamente desfavorables al mantenimiento de su viabilidad, principalmente debido al estrés oxidativo y osmótico (Ball, 2008).

Según la velocidad de la curva de enfriamiento y descongelamiento las técnicas de criopreservación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta, descongelación rápida, congelación ultra rápida y vitrificación (Ávila-Portillo y col., 2006).

3.2.1. Congelación lenta

La congelación lenta es el procedimiento más utilizado actualmente en clínicas de reproducción asistida. Una vez se han añadido los crioprotectores a la muestra y ha sido repartida en varios criotubos o pajuelas, se va descendiendo su temperatura paulatinamente. Finalmente, se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido (Sánchez y col. 2013)

3.2.2. 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 y el criodaño. (Isachenko, E. y col., 2003) Este método no utiliza crioprotectores permeables, que pueden implicar riesgo mutagénico, y se realiza en espermatozoides

obtenidos por métodos de selección espermática, lo que garantiza una alta motilidad, y al estar desprovistos de plasma seminal disminuye el riesgo de transmisión de infecciones virales y bacterianas (Isachenko, V. y col., 2012)

3.3. Crioprotectores

Son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor. Los crioprotectores se clasifican en penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular según lo descrito por Ávila-Portillo en el 2006:

3.3.1. Crioprotectores penetrantes

Son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH). La particularidad que presenta el glicerol es que el grado de penetración en la célula disminuye con la temperatura (de 20° a 0°C). Al incorporar glicerol en el medio isotónico, éste se vuelve inmediatamente hipertónico y la célula que se encuentra en él reaccionará liberando agua a fin de equilibrar la diferencia de gradiente osmótico. Posteriormente, dada que el glicerol penetra en la célula, esta incorporará agua, de acuerdo a la concentración de glicerina en su citoplasma.

3.3.2. Crioprotectores no penetrantes

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sucrosa, glucosa, rafinosa, dextrosa y dextrano.

Los azúcares tienen una solubilidad y viscosidad que depende de su estructura química, la rafinosa (trisacárido) es menos soluble que la sucrosa (disacárido) y esta es menos soluble que la glucosa (monosacárido) (Sánchez y col., 2012). Los azúcares son denominados búferes o tampones osmóticos; no son permeables a la membrana celular, pero crean una gran presión osmótica en el medio, ante la cual la célula responde eliminando el agua para equilibrar las presiones, por lo tanto, deshidratándose

3.4. Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Las ERO incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y desempeñan un papel importante en la señalización celular. Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía liberan ERO. Las células poseen mecanismos de defensa denominados genéricamente como antioxidantes. El espermatozoide dispone de mecanismos enzimáticos como:

- superóxido dismutasa (SOD), capta el radical anión superóxido (O_2^-) mediante una dismutación para convertirlo en peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- glutatión peroxidasa/glutatión reductasa, neutralizan al H_2O_2
- citocromo oxidasa, evita la reducción univalente del oxígeno.
- El plasma seminal es una potente fuente de antioxidantes compuesta por:
 - Enzimas antioxidantes de alto peso molecular: SOD, glutatión peroxidasa/glutatión reductasa, catalasa
 - Antioxidantes de bajo peso molecular: tocoferol o vitamina E, neutralizan al radical oxhidrilo (OH) y se encuentran en la membrana

- Vitamina C, es un reductor que reacciona rápidamente con el oxígeno y con el OH, también capta el oxígeno singlete (O) y el ión hipoclorito
- Glutación, puede captar el H₂O₂, O y OH
- Albúmina, piruvato, β-carotenos, taurina, ácido úrico.

Los niveles patológicos de especies reactivas de oxígeno (ERO) detectados en el semen de hombres infértiles generalmente se deben a un incremento en la producción y no a una reducción en la capacidad antioxidante del plasma seminal. Uno de los efectos de las ERO es la alteración de la membrana celular mediante peroxidación lipídica (PL). Este proceso fisiopatológico tiene como resultado una cascada de profundos cambios degradativos que afectan la organización y función de la membrana del espermatozoide humano, producen rupturas del ADN y degradación proteica. (Koppers y col., 2010).

En la capacitación espermática, las ERO también juegan un papel decisivo, se ha comprobado que bajo condiciones fisiológicas y de forma controlada, la producción de ERO es de vital importancia para la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide (Hernández y col., 2010). Por otra parte, se conoce que las ERO pueden incidir negativamente sobre la fertilidad masculina a través de dos mecanismos fundamentales. El primero de ellos es el daño que provocan a la membrana espermática, lo cual da lugar a una reducción de la movilidad y habilidad del espermatozoide de fusionarse con el óvulo. En tanto, el daño que las EROs ejercen directamente sobre el ADN espermático, es otro de los mecanismos a través del cual afectan la genómica paternal del embrión. La integridad del ADN constituye un indicador de la espermatogénesis y de la fertilidad masculina. (Tremellen, 2008)

3.4.1. Fragmentación del ADN y EROs

La integridad de la estructura de la cromatina espermática depende de factores endógenos como la maduración

espermática y exógenos como el daño peroxidativo del ADN, infecciones, factores inmunológicos o diversos agentes químicos (Paparella y col., 2015). La fragmentación del ADN consiste en interrupciones en las cadenas simples o dobles. La transferencia de la molécula de ADN integra e intacta desde el espermatozoide al óvulo es esencial para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito. Una ruptura podría llevar a alteraciones en la fertilización, en el desarrollo embrionario y fetal e incluso puede afectar la salud de la descendencia. Aproximadamente el 25% de hombres infértiles tienen elevado porcentaje de fragmentación del ADN. Este daño es multifactorial y puede producirse en cualquier etapa del proceso espermatogénico (Erenpreiss y col., 2009). Altos niveles de ERO alteran la movilidad y la morfología espermática, provocan fragmentación del ADN que puede acelerar el proceso de apoptosis de las células germinales, disminuyendo la concentración espermática con el consecuente deterioro de la calidad seminal (Morales y col., 2007)

El test de fragmentación de ADN se basa en dos fenómenos: el primero es que las hebras de ADN que contienen rupturas son más fáciles de ser desnaturalizadas. De hecho, los extremos de las rupturas, que pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble, son los orígenes de la desnaturalización cuando éstos se enfrentan a un tratamiento de carácter ácido (Quintero y col., 2015). El segundo fenómeno es que los bucles compactados de fibra de cromatina nuclear, compuestos de ADN y proteínas, se desempaquetan cuando se extraen proteínas nucleares. Este proceso de relajación de los bucles de cromatina tras un tratamiento desproteinizante da lugar a halos periféricos de cromatina/ ADN que emanan del residuo nuclear central (Paparella y col., 2015)

3.5. Antioxidantes:

El antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que, cuando presente en bajas concentraciones comparadas a la del sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato. En condiciones normales, los antioxidantes convierten ERO en agua protegiendo las células y el organismo de los efectos nocivos ocasionados por la sobreproducción. (Sies, 2001).

3.5.1. Butilhidroxitolueno (BHT):

El Butilhidroxitolueno es un análogo sintético de la vitamina E, cuyo efecto antioxidante se atribuye a su capacidad de contener la cascada de peroxidación lipídica por la conversión de peroxil en hidroperóxido lipídico (Aitken y Clarkson, 1988). El BHT fue probado en espermatozoides de búfalos (Ijaz y col., 2009), toros (Ansari et al., 2011), chivos (Memon y col., 2011), en la mayoría de los casos, se observó un aumento en la motilidad, la integridad de la membrana plasmática y la viabilidad espermática. El BHT es una sustancia sólida blanca y cristalina, con masa molar de 220,36 g / mol, consistente en 81,76% de carbono, 10,98% de hidrógeno y 7,26% de oxígeno (C₁₅H₂₄O) (Babich, 1982).

Esta sustancia se obtiene sintéticamente a partir de p-cresol e isobutileno; es insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos como tolueno, metanol, etanol, isopropanol, etilmetilcetona, acetona, éter de petróleo, benceno, Dimetilsulfóxido (DMSO) y en la mayoría de los demás disolventes de hidrocarburos.

El BHT es un antioxidante fenólico sintético, utilizado en la fabricación de diversas sustancias como aditivo alimenticio, componiendo formulaciones de productos cosméticos, además de su utilización para la producción de plásticos, aceites, lubricantes, vitaminas y aromas (Babich, 1982).

4. ANTECEDENTES

En contraste con la técnica de congelación lenta convencional, la vitrificación de los espermatozoides requiere altas velocidades de enfriamiento, lo que podría ser perjudicial para los espermatozoides (Isachenko E, 2002); por lo que en un estudio en 2004, Isachenko y col. compararon espermatozoides congelados lentamente y vitrificados en términos de su integridad y motilidad del ADN después de la descongelación, donde se demuestra que la motilidad de los espermatozoides convencionalmente (lentamente) congelados con un crioprotector permeable fue similar al registrado para los espermatozoides vitrificados en ausencia de crioprotector (47 versus 52%). La integridad del ADN no se vio afectada por el método de crioconservación o presencia de crioprotectores. Refieren además que la vitrificación es un método rápido, simple y no requiere equipos criobiológicos especiales.

Por otro lado, un estudio publicado en 2011 demostró el efecto de la congelación ultrarrápida (vitrificación) sobre la función espermática de 10 donantes normozoospermicos. Los espermatozoides se seleccionaron por Swim-up y la solución espermática se dividió en dos subfracciones. Una fracción se vitrificó sumergiéndola directamente en nitrógeno líquido mientras que la segunda se utilizó como control. En ambas fracciones se determinaron viabilidad, movilidad, potencial de membrana mitocondrial (YMMit), integridad del ADN, reacción de acrosoma espontánea e inducida, y superóxido intracelular (O₂⁻). No obstante, determinaron que existe una significativa activación de la producción de especies reactivas de oxígeno, que conlleva a una prematura capacitación espermática, por lo que aseguran que futuros estudios con adición de antioxidantes a los medios de congelación son necesarios para optimizar esta técnica.

Las especies reactivas de oxígeno (EROS), tienen la capacidad de alterar irreversiblemente la función celular. Se ha propuesto que las EROS modifican la bioquímica del espermatozoide. Por otro lado, los mecanismos antioxidantes pudieran proteger a los espermatozoides del daño producido por las EROS, por ello la medición de antioxidantes y oxidantes pudieran servir para evaluar la infertilidad humana (Gallardo, 2007)

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia, en la actualidad los parámetros obtenidos a través de un seminograma no dan una información completa sobre el potencial fecundante del semen y la capacidad de dar lugar a un embrión sano y un embarazo evolutivo. (Quintero y col., 2015). Es por ello que ha aumentado el interés en desarrollar técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático, ya que en cualquier etapa de la espermatogénesis se podría producir un daño irreversible afectando los parámetros de calidad seminal.

En el año 2008 Shoaie y col. demostraron que el butilhidroxitolueno (BHT) minimiza la rotura de la membrana inducida por el frío en espermatozoides de toro. Así mismo en el año 2011, Ansari y col. evaluó el efecto de la suplementación con butilhidroxitolueno en los parámetros sobre la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides de toro Sahiwal, obteniendo resultados favorables para la concentración de 0.5mM. Por lo que estas investigaciones abrirían paso a estudios en semen humano.

Un estudio publicado en el 2014 determinó el efecto crioprotector del BHT en una solución de vitrificación en los espermatozoides humanos. Los espermatozoides se seleccionaron mediante Swim-up y se vitrificaron en paja cerrada utilizando una combinación de líquido tubárico humano (HTF), sacarosa y BHT 1 mM (VMBHT), o solo HTF y sacarosa (VM). La concentración óptima de BHT se determinó mediante la observación de la movilidad espermática progresiva después del calentamiento y la detección de la membrana plasmática, el potencial mitocondrial de la membrana (PSM) y la integridad del ADN. También se detectó la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). El butilhidroxitolueno conservó significativamente la integridad del ADN y redujo la producción de ROS. La membrana plasmática y PSM no mostraron diferencias estadísticas. Un BHT milimolar mantuvo efectivamente la función celular y, debido a sus propiedades antioxidantes y antivirales, se pudo utilizar en la criopreservación de semen de pacientes con infecciones virales transmitidas por plasma seminal. (Merino y col. 2014)

5. HIPOTESIS

Si se logra establecer el tratamiento correcto de Butilhidroxitolueno en el medio de vitrificación incrementará el efecto antioxidante y mejorará la función espermática en el semen humano criopreservado y se le podrá dar un uso complementario al realizar técnicas de criopreservación de la fertilidad masculina.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Lugar de ejecución:

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP)

6.2. Tipo y diseño de investigación:

Se realizó un estudio descriptivo. El diseño de la investigación fue experimental.

6.3. Población de estudio:

La población de estudio estuvo conformada por 20 individuos de sexo masculino con edades comprendidas entre 20 y 30 años, los cuales donaron su esperma vía masturbación de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud entre los meses de Octubre 2018 – Noviembre 2018.

6.4. Variables

Variable dependiente

Parámetros seminales: motilidad, vitalidad, concentración, morfología y test fragmentación ADN.

Variable independiente

Concentraciones de Butilhidroxitolueno

6.5. Operacionalización de las variables

Variables	Indicadores	Valor Final	Tipo de Variable
Tiempo de Licuefacción	Unidimensional Cronómetro	Minutos	Cuantitativa discreta
Viscosidad	Multidimensional Pipeta	Normal o Aumentado	Cualitativa nominal
pH	Tiras pH	8.0	Cuantitativa continua
Volumen	Unidimensional Pipeta	Mililitros (ml)	Cuantitativa continua
Concentración	Microscopio y Cámara Neubauer	Millones ($\times 10^6$)	Cuantitativa continua
Motilidad	Microscopio	Porcentaje	Cuantitativa discreta
Vitalidad	Microscopio y Eosina	Porcentaje	Cuantitativa discreta
Morfología	Microscopio y Solución de fijación	Porcentaje	Cuantitativa discreta
Leucocitos (Células redondas)	Microscopio y Kit Coloración Gram	Porcentaje	Cuantitativa continua
Test de Determinación del Nivel de O2-	Microscopio y Kit Oxisperm	Bajo o Alto	Cualitativa nominal
Test Fragmentación ADN	Microscopio y Kit Halosperm	Porcentaje	Cuantitativa discreta

6.6. Muestreo

Las muestras frescas de semen humano, se obtuvieron de 20 donantes seleccionados con características normozoospermicas, los cuales tuvieron un período de abstinencia sexual de 2 a 3 días, éstas fueron identificadas con números (1 al 20). Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas URP siguiendo las pautas de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010).

6.7. Determinación de los parámetros seminales en semen fresco:

6.7.1. Análisis macroscópico de la muestra:

La evaluación macroscópica se realizó a temperatura ambiente y se analizaron los parámetros seminales: Apariencia, Tiempo de Licuefacción, Viscosidad, pH del semen y Volumen siguiendo las pautas del manual de la OMS 2010.

Apariencia:

Se evaluó el aspecto de la muestra describiendo el color. Teniendo en cuenta color blanco, gris, amarillo y rojizo.

Tiempo de Licuefacción:

Se dejó la muestra en reposo entre 15 a 30 minutos para luego observar el grado de licuefacción, si ésta no se licua se agregará un volumen igual de dilutor (solución salina) con una pipeta de 2ml y se mezclará (el factor de dilución luego será indicado para el recuento espermático).

Viscosidad:

Se determinó observando la longitud del filamento que se forme al dejar caer con gotero la muestra; se clasificó en normal, ligeramente aumentada, aumentada y muy aumentada.

pH:

Para el pH se homogenizó la muestra y se colocó una gota de semen con una pipeta Pasteur estéril, se dispersó sobre una tira de pH de rango 6.0 a 10.0 y se esperó a que el color se torne uniforme (<30 segundos) y se comparó con las tonalidades de rangos de pH.

Volumen:

El volumen del eyaculado se midió aspirando la muestra total con una pipeta graduada

6.7.2. Análisis microscópico de la muestra:

La evaluación macroscópica se realizó a 37°C y se analizaron los parámetros seminales: Concentración, Motilidad, Vitalidad y Morfología siguiendo las pautas del manual de la OMS 2010.

Concentración:

En una lámina se colocó una gota de muestra (10ul) y se realizó un frotis, se dejó en reposo 1 minuto a 37°C, se observó al microscopio de campo claro y se contabilizaron los espermatozoides. Según el número de espermatozoides que se contaron se les realizó una determinada dilución.

Se cargaron ambas sub-cámaras de la cámara de Neubauer, con 10ul de semen diluido previamente y se analizó bajo un microscopio de fase de contraste a 400x, se evaluó la muestra luego de 5 minutos de reposo contando 200 espermatozoides.

Los resultados fueron evaluados calculando la suma y diferencia de los dos contajes.

Para diluciones 1/5, 1/20, 1/50, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{N^{\circ} \text{ spz}}{N^{\circ} \text{ filas}} \times \frac{1 \text{ fila}}{20 \text{ nl}} \times \text{Factor Dilución} = C \times 10^6 \text{ spz/ml}$$

Fuente: Manual OMS 2010

Motilidad:

En una lámina se colocó una gota de muestra (10ul) y se realizó un frotis, se dejó secar y se observó al microscopio de campo claro y se contabilizaron los espermatozoides con motilidad progresiva, motilidad in-situ y los no motiles.

Primero se contaron los espermatozoides con motilidad progresiva, luego los espermatozoides con motilidad no progresiva y por último los inmóviles. Se realizó un doble contaje y se evaluaron 3 campos de 200 espermatozoides respectivamente (OMS, 2010).

Morfología:

En un tubo Eppendorf se colocaron 10ul de muestra descongelada y 190ul de Solución de fijación, la cual se homogeneizó, se colocó una gota (10ul) en una lámina portaobjetos, se realizó un frotis usando un cubreobjetos y se observó al microscopio de campo claro. Se contabilizaron los espermatozoides anormales y los espermatozoides normales (OMS, 2010)

Conteo de Leucocitos (Células redondas):

Para este procedimiento se usó el método de tinción propuesto por Hans Gram (1884). Se colocó una gota de la muestra de semen en una lámina portaobjetos y se realizó un extendido con un cubreobjetos. Se dejó secar a temperatura ambiente o utilizando un mechero. Se procedió a colorar con el kit de tinción Gram: Se fijó la muestra con metanol durante un minuto, luego se agregó azul violeta y se esperó un minuto. Se enjuagó con agua no directamente sobre la muestra, luego se agregó Lugol y se esperó un minuto aproximadamente. Se agregó alcohol acetona y se esperará entre 30 segundos y se enjuagó con agua no directamente sobre la muestra. Finalmente se agregó safranina o fucsina básica, se esperó un minuto y se lavó levemente con agua.

Se observó al microscopio y con la siguiente formula se realizó el conteo de las células leucocitarias:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Concentración spz} \times N^{\circ} \text{ células redondas}}{400} = \text{millones/ml}$$

- Si se cuentan menos de 400 células redondas el error es superior al 5%, y aparte del resultado hay que informar el error asociado al N.º de espermatozoides contados.
- Si se cuentan menos de 25 células redondas, el error es superior al 20%, que recordemos se consideraba el error máximo permitido para poder dar un resultado respetable.

Por lo tanto, el resultado se acompaña con el comentario de que el número de células redondas contadas es demasiado pequeño para poder asegurar esa concentración.

Test de Determinación del Nivel de Aniones Superóxido

Se trabajó con el kit Oxisperm® el cual permitió determinar el exceso de aniones superóxido causados por leucocitos y espermatozoides anormales presentes en el eyaculado, se basa en la reacción del azul de nitrotetrazolio (NTB) el cual tiene la capacidad de solubilizar la sal nitrotetrazolio en agua para convertir la acción de los aniones superóxido reaccionando de manera colorimétrica en función de la concentración de éste, formando un precipitado de color variable.

Se colocó en un tubo Eppendorf 50ul del gel reactivo usando el flotador en el cristal de precipitación y se calentó en baño María a 90° durante aproximadamente 5 minutos. Se redujo la temperatura del reactivo a 37°C colocando el tubo en la estufa a 37° C. Luego se mezcló 50ul del gel reactivo con 50ul de la muestra de semen en uno de los tubos eppendorf que se incluyen en el kit. Se trató de evitar burbujas en la mezcla resultante y se gelificó la mezcla a 4°C durante 5 minutos. Posterior a ello, se incubó en la estufa durante 45 minutos a 37°C y se comparó el color de la muestra con el color del esquema desde ligeramente rosado hasta morado o casi negro. La intensidad del color se relaciona con la concentración del anión superóxido presente en la muestra.

6.8. Capacitación espermática en gradiente de densidad:

Se usó la gradiente Sil Select Plus (FertiPro®) formado por una fase de 45% y 90%. Se colocó en un tubo falcon de 15ml: 1ml de 45, 1ml de 90 y 2ml de muestra de semen. Se centrifugó a 1500rpm x 10min y se eliminó el sobrenadante. Luego en un tubo falcon de 15ml se colocó 2ml de medio HTF+BSA 1% y se introdujo el pellet. Se centrifugó a 1500rpm x 10min y se eliminó el sobrenadante.

Al término de la capacitación se realizó un conteo de espermatozoides, si la concentración fue superior a 10 millones de spz/ml se realizó una dilución para llegar a 10^6 , se analizaron además los parámetros de motilidad, vitalidad y test de dispersión de la cromatina espermática (SCD)

6.8.1. Técnica de Dispersión de Cromatina Espermática (SCD)

Se realizó el test de Fragmentación de ADN mediante la técnica de Dispersión de Cromatina Espermática (SCD) (Evenson y col.,1991), para analizar el grado de fragmentación de ADN espermático.

Para el SCD, se necesitaron láminas con agarosa de punto de fusión normal sobre la cual se añadieron 30ul de la mezcla de 10ul de semen (10 millones) y 75ul de agarosa de bajo punto de fusión al 1% caliente, se dejó enfriar la lámina a 4 °C durante 4 minutos para proceder al tratamiento químico de desnaturalización proteica con HCl 0.8N dentro de una campana de extracción durante 5 minutos, inmediatamente después se trató la lisis de ADN según lo establecido por Halosperm® el cual es un kit de diagnóstico in vitro, durante 25 minutos, luego se lavó con agua destilada durante 10 minutos y por último se efectuó el tratamiento de deshidratación con dos tipos de alcohol etílico al 70% durante 2 minutos y luego al 96% por 2 minutos más. La tinción se realizó con Wright durante 12 minutos. Se dejó secar en la estufa antes de la lectura. Así, los valores del Índice de Fragmentación (IDF) :(Evenson y col.,1999) a tomar en cuenta fueron

ID bajo <16%, IDF medio \geq 16%, IDF alto>29%

Las unidades de valoración arbitrarias son el índice de fragmentación. Se contaron 100 células por muestra a un aumento de 40x. La clasificación a usar fue la siguiente:

- **Halo Grande:** Tamaño del halo debe ser superior al diámetro de core celular, indicando esto una integridad en su ADN
- **Halo Mediano:** Tamaño del halo debe ser igual al diámetro de core celular, indicando esto una integridad en su ADN
- **Halo Pequeño:** Tamaño del halo menor al core celular, indicando esto un daño en la integridad de su ADN
- **Sin Halo:** Ausencia de halo, indicando esto un daño en la integridad del ADN
- **Degradado:** Sin halo y core difuso y degradado, indica daño en la integridad del ADN.

6.9. Preparación de Tratamientos para la Vitrificación:

En un tubo Eppendorf se depositó 600ul de HTF con 1% HSA conteniendo aproximadamente 8×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente se adicionaron 600ul de sucrosa 0.5M en HTF y se dejó equilibrar la solución durante 5 min, con una concentración final de sucrosa 0.25 M y se adicionó la cantidad de BHTmM (Sigma-Aldrich), de acuerdo a Khalifa and El-Saidy (2006).

- Control: HTF + HSA 1% + 0.25M de sucrosa
- T1: 0.5mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25M de sucrosa
- T2: 1mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25M de sucrosa
- T3: 1.5mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25M de sucrosa
- T4: 2mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25M de sucrosa

Se preparó un contenedor con nitrógeno líquido al cual se le insertara una rejilla para recibir la muestra procesada. La vitrificación se llevó a cabo formando perlas de 20ul, las cuales se obtuvieron posicionando la micropipeta de 100ul en ángulo de 45° a 10 cm por encima de la superficie del nitrógeno. Se dejó caer una gota cada 5 segundos esperando que se solidifique y se depositó en el fondo de la rejilla. Una vez finalizado este procedimiento, las perlas se colocaron en crioviales y fueron almacenadas en el tanque de nitrógeno líquido por un mínimo de 24 horas para su posterior análisis, el procedimiento fue similar al realizado por Sánchez (2012)

6.10. Análisis de parámetros seminales post-vitrificación:

Se retiraron los crioviales del tanque de nitrógeno líquido y se agitaron suavemente durante 5 segundos. La suspensión resultante se incubó a 37°C durante 10 min hasta que alcancen el estado líquido y se procedió a evaluar los parámetros seminales de acuerdo al manual de la OMS 2010: Motilidad, Vitalidad y Test de Fragmentación de ADN.

6.11. Análisis estadísticos

Con la obtención de los datos y la evaluación de los parámetros seminales de los tratamientos se procedió a elaborar el informe estructurado haciendo uso del programa SPSS con un 95% de confiabilidad. Los parámetros evaluados fueron expresados en media y desviación estándar. Se realizó una tabla de frecuencias para obtener gráficos estadísticos en Excel.

6.12. Aspecto Ético

Dentro de las consideraciones éticas para el desarrollo de esta investigación se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

VI. RESULTADOS

Se evaluaron 20 muestras de donantes jóvenes en edades comprendidas entre 20 y 30 años

6.1. Determinación de parámetros seminales en semen humano fresco

6.1.1. Análisis seminal en parámetros macroscópicos

Apariencia

El 60% de las muestras analizadas presentaron una apariencia de blanco lechoso, el 25% blanco amarillento, el 10% blanco opaco y el 5% blanco traslucido.

Viscosidad

El 70% de las muestras analizadas presentaron una consistencia viscosidad normal y el 30% una viscosidad ligeramente aumentada.

Tiempo de licuefacción

Con respecto al tiempo de licuefacción se obtuvo que todas las muestras llegaron a licuefacción completa, y en relación al aspecto del semen, se obtuvo que todas las muestras fueron de aspecto homogéneo.

Volumen

Para el parámetro de volumen se obtuvo una media de 2.005 ± 0.2481 , con un mínimo de 1.6 ml y un máximo de 2.5 ml en el análisis seminal realizado (Tabla 4).

pH

Para el criterio de pH se obtuvo una media de 7.580 ± 0.3473 , con un mínimo de 7.2 y un valor máximo de 8.5 en los espermogramas realizados (Tabla 4)

Test anión superóxido

Al aplicar el test de anión superóxido aplicado a las muestras en fresco se obtuvo una media de 2.25 ± 0.639 (Tabla 4) en donde el 10% corresponde al Nivel 1 de oxidación muy bajo, el 35% al Nivel 2 de oxidación normal, el 50% al Nivel 3 de oxidación moderada y el 5% al Nivel 4 de oxidación alta (Tabla 2)

6.1.2. Análisis seminal en parámetros microscópicos

Conteo de leucocitos

Referente al conteo de leucocitos se obtuvo una media de 0.6435 ± 0.15702 , con un mínimo de $0.41 \times 10^6/\text{ml}$ y un máximo de $0.96 \times 10^6/\text{ml}$ en el análisis seminal realizado (Tabla 4).

Concentración

Para la concentración inicial se obtuvo una media de 84.3935 ± 0.82420 , con un mínimo de $63.22 \times 10^6/\text{ml}$ y un máximo de $94.96 \times 10^6/\text{ml}$ en el análisis seminal realizado (Tabla 4).

Motilidad Progresiva

En el parámetro de motilidad progresiva se obtuvo una media de $56.7380\% \pm 4.610633$, con un mínimo de 50.90% y un máximo de 66.16%. (Tabla 5, 6) (Gráfico 1)

Vitalidad

En cuanto al parámetro de vitalidad se obtuvo una media de $57.945\% \pm 2.70825$, con un mínimo de 85.84% y un máximo de 93.21%. (Tabla 5, 7) (Gráfico 2)

Morfología

En el parámetro de motilidad progresiva se obtuvo una media de $56.7380\% \pm 4.610633$, con un mínimo de 50.90% y un máximo de 66.16%. (Tabla 4)

6.2. Análisis de parámetros seminales en semen humano capacitado

Motilidad

Respecto al parámetro de motilidad progresiva se obtuvo una media de 90.459% \pm 2.003029, con un mínimo de 85.84% y un máximo de 93.21%. (Tabla 5, 6) (Gráfico 1).

Vitalidad

En cuanto al parámetro de vitalidad se obtuvo una media de 91.7575% \pm 1.92171, con un mínimo de 88.66% y un máximo de 94.68%. (Tabla 5, 7) (Gráfico 2).

Fragmentación ADN

Referente al parámetro de fragmentación de ADN se obtuvo una media de 13.19% \pm 1.5886, con un mínimo de 10.38% y un máximo de 15.83% (Tabla 5, 8) (Gráfico 3).

6.3. Comparación de la calidad seminal de semen post-vitrificado con tratamientos.

Motilidad

La motilidad progresiva espermática tuvo una variación significativa en cada tratamiento con Butilhidroxitolueno respecto al grupo control con un valor de 57.58% \pm 2.75, a 37.7880% \pm 2.747% en el T1, en T2 a 60.295% \pm 4.10%, en T3 a 43.82% \pm 1.88% y en T4 a 34.1895% \pm 2.21%. (P <0,05) (Tabla 6) (Gráfico 1)

Vitalidad

La vitalidad espermática al igual que la motilidad espermática tuvo una variación significativa en cada tratamiento con Butilhidroxitolueno en comparación con el grupo control, de 59.165% \pm 5.49% a 77% \pm 4.5% en T1, a 72,94% \pm 5,29% en T2, a 67,84% \pm 7,16% en T3 y 59,35% \pm 5,43% en T4. (P <0,05) (Tabla 7) (Gráfico 2)

6.4. Efecto antioxidante del Butilhidroxitolueno en el test de dispersión de la cromatina espermática (SCD)

La mayor frecuencia en el efecto del Butilhidroxitolueno en la fragmentación de ADN fue de manera similar tanto en el T3 con una media de $21.33\% \pm 0.56$ y en T4 con una media de $21.91\% \pm 1.08$; de los 20 casos, la menor alteración fue en el T2 (1mM BHT+HTF HSA 1% + 0.25 mol/L de sucrosa) la cual tuvo una media de $14.32\% \pm 0.99\%$, mientras que el T1 tuvo una media de $19.78\% \pm 0.85$ (Tabla 8) (Gráfico 3)

VII. DISCUSION

La criopreservación de espermatozoides se ha convertido en una técnica de rutina en el manejo de la infertilidad masculina humana. Introducido en la década de 1960 (Sherman, 1973), ha superado muchas limitaciones de espacio y tiempo y ahora es una parte integral de las tecnologías de reproducción asistida (Isachenko y col., 2012; Sánchez y col., 2012). Recientemente, la vitrificación se ha descrito como una técnica alternativa para la criopreservación de espermatozoides (Isachenko y col., 2012).

El BHT, un análogo sintético de la vitamina E, protege las células y los tejidos (Kell y col., 1987). También es un antioxidante extremadamente eficaz y aumenta la fluidez de la membrana cuando se incorpora a la membrana del esperma (Khalifa y col., 2006; Shoaie y col., 2008). De esta manera, puede prevenir o reducir los cambios de permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides cuando las células reciben un shock en frío. Por otro lado, BHT podría prevenir la reacción de autooxidación al convertir los radicales peroxilo a hidroperóxidos (Aitken y Clarkson, 1988).

Debido al estrés oxidativo inducido por la congelación y la descongelación, el sistema antioxidante del plasma seminal y los espermatozoides se ven comprometidos durante el procesamiento del semen (Ijaz y col., 2009). Una adición excesiva de sustancias antioxidantes al extensor del semen puede neutralizar el estrés oxidativo y también puede detener las funciones espermáticas normales asociadas con ROS. En este trabajo los resultados han sido obtenidos, observándose una disminución en los principales parámetros espermáticos (motilidad y vitalidad espermática) en los tratamientos con las concentraciones más altas de 1.5mM y 2mM de Butilhidroxitolueno. Por lo tanto, es importante seleccionar las concentraciones de antioxidantes adecuadas para mantener el equilibrio natural que existe entre la generación de ROS y las actividades metabólicas (Aitken y Clarkson, 1988).

El efecto protector y antioxidante del BHT en la protección de los espermatozoides varía ampliamente con la concentración utilizada (Memon y col., 2011). La concentración de 1mM demostró previamente que la exposición de espermatozoides humanos a BHT en medio de vitrificación no afectaba las propiedades de los espermatozoides (Aitken y Clarkson, 1988; Roca y col., 2004; Ijaz y col., 2009). Por ello en este estudio se consideró el rango de 0.5mM a 2mM para realizar la comparación respectiva a los parámetros seminales principales motilidad, vitalidad y fragmentación de ADN.

Los espermatozoides humanos son extremadamente susceptibles al estrés oxidativo (Hernández y col.2010), razón por la cual en este trabajo se usó como indicador el test de fragmentación de ADN: Dispersión de la cromatina espermática (SCD) mostrando una disminución significativa al usar la concentración de 1Mm (14.32%). En este estudio, las condiciones experimentales que utilizan una combinación de medio de vitrificación / medio BHT mostraron una poderosa relación entre la presencia de ROS y la fragmentación del ADN, con un aumento significativo del índice de fragmentación en los espermatozoides posteriores a la vitrificación sin BHT. Se ha determinado el importante papel que desempeñan las mitocondrias de esperma en la creación de ROS durante el proceso de congelación y descongelación (Koppers y col., 2010; Cortés y col, 2007; Berrios y Sánchez, 2011).

Los datos generados en este estudio proporcionan evidencia sobre el efecto antioxidante de BHT sobre la función de espermatozoides posterior a la vitrificación deduciendo que el uso del antioxidante BHT en la solución de vitrificación en la concentración de 1mM en serviría en técnicas de criopreservación en reproducción humana para mejorar la calidad de los parámetros seminales post descongelación.

VIII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

- Se comprobó que los parámetros seminales en fresco tanto macroscópicos como microscópicos se encontraron dentro de los valores normales según el manual de la OMS (2010).
- Se determinó que los parámetros seminales en semen capacitado se encontraron dentro de los rangos esperados ya que la concentración de los espermatozoides obtenidos contó con mejores capacidades de su función espermática.
- Se determinó que la concentración de 1mM de Butilhidroxitolueno (BHT) aumenta significativamente los parámetros de motilidad y vitalidad en la calidad espermática en humanos respecto a los demás tratamientos y el control.
- Se comprobó que el efecto antioxidante del BHT sobre la calidad de ADN espermática es más eficaz en la concentración 1mM, sin embargo, el estrés oxidativo está presente en los cuatro tratamientos con respecto a la muestra capacitada.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere continuar la complementación de un diagnóstico seminal con pruebas más complejas como potencial de membrana mitocondrial y el análisis de membrana plasmática con lectinas fluorescentes.
- Realizar nuevas investigaciones con otros antioxidantes que aumenten la calidad seminal en humanos y puedan disminuir los problemas de infertilidad en varones, y comparar resultados con este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AITKEN, J., CLARKSON, S. (1998). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9 (1), pp.367–376.
- ANDERSON, S., HARKNESS, W., AKIN Y., KAPROTH, M., KILLIAN, G. (1994). Categorical data analysis of the effect of bull fertility of butylated hydroxytoluene addition to semen extenders prior to freezing. *Journal of Dairy Science*, 77 (2), pp.2302–2307.
- ANSARI, M. S., RAKHA, B., AKHTER, S. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene supplementation in extender on motility, plasmalemma and viability of sahiwal bull spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology*, 43 (2), pp.311-314.
- ÁVILA-PORTILLO, L., MADERO, J., LÓPEZ, C., LEÓN, M., ACOSTA, L., GÓMEZ, C., DELGADO, L., GÓMEZ, C., LOZANO J., REGUERO, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), pp.291-300.
- BABICH, H. (1982). Butylated Hydroxytoluene (BHT): A Review. *Environmental Research*, 29 (1), pp.1-29.
- BALL, B. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107 (1), pp.257–267.
- BERRIOS, O., SÁNCHEZ, R. (2011). Congelación Ultra Rápida de Espermatozoides Humanos: Efecto sobre la Función Espermática y Producción de Especies Reactiva de Oxígeno. *Int. J. Morphol.* 29(3), pp.899-906
- CATANZARITI, F., CANTORO, U., LACETERA, V., MUZZONIGRO, G., POLITO, M. (2013). Comparison between WHO (World Health Organization) 2010 and WHO 1999 parameters for semen analysis -

interpretation of 529 consecutive samples. *The Archives of Italian Urology and Andrology*, 85(3) pp.125-9.

- CORTÉS, E., DÁVILA, M., LÓPEZ, C., FERNÁNDEZ, J., GOSÁLVEZ, J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas urológicas españolas*, 31(2) pp.120-131
- DOHLE, G., DIEMER T., GIWERCMAN, A., JUNGWIRTH, A., KOPA, Z., Ykrausz C. (2010). Guía clínica sobre la infertilidad masculina. *European Association of Urology*.
- ERENPREISS, J., SPANO, M., ERENPREISA, J., BUNGUM, M., GIWERCMAN, A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*, 8(1), pp.11-29.
- EVENSON, D., JOST, L., BAER, R., TURNER, T., SCHRADER, S. (1991). Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive toxicology*, 5(2), pp.115-125.
- EVENSON, D., JOST, L., MARSHALL, D., ZINAMAN, M., CLEGG, E., PURVIS, K., DE ANGELIS, P., CLAUSSEN, O. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction*, 14(4), pp.1039-1049.
- GALLARDO, J. (2007) Evaluación del Sistema antioxidante en el semen normal. *Revista de Investigación Clínica*, 59 (1), pp 42-47.
- GRISWOLD, M. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod*, 52(1), pp.211-216.
- GONZÁLEZ, G. (1992). Andrología endocrina: Andrología, fertilidad e infertilidad. *Gonzáles Editor*, IIA – UPCH, pp.13-20.

- HERNÁNDEZ, Y., DELGADO L., LÓPEZ R., MARTÍNEZ, G., MALLOK, A. (2010). Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 18(3), pp.153-158.
- IJAZ, A., HUSSAIN, A., ALEEM, M., YOUSAF, M., REHMAN, H. (2009). Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 7(1), pp.1326–1329.
- ISACHENKO, E., ISACHENKO, V., KATKOV, I., DESSOLE, S., NAWROTH, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine*, 6(2), pp.191-200.
- ISACHENKO, V., ISACHENKO, E., PETRUNKINA, A., SÁNCHEZ, R. (2012). Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), pp.323–326.
- KEELL, B. A., WEBSTER, B. ROBERTS, D. (1987). Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 81(1) pp.213- 20.
- KHALIFA, T., EL-SAIDY, B. (2006) Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Am-Euras J Agric Environ Sci*, 1, pp.288–293.
- KOPPERS, J., GARG, L. AND AITKEN, J. (2010). Stimulation or mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radical Biology & Medicine*, 48 (1), pp.112 - 119.
- MAZUR, P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*, 47, pp.347–369

- MAZZILLI, F.; DELFINO, M.; IMBROGNO, N.; ELIA, J., DONDERO, F. (2006). Survival of micro-organisms in cryostorage of human sperm. *Cell Tissue Bank.*, 7(2), pp. 75-9.
- MCANINCH, W., LUE, F. (2019). Smith y Tanagho, Urología general (18th ed.). *LANGE*.
- MEMON, A., WAHID, H., ROSNINA, Y., GOH, Y., EBRAHIMI, M., NADIA, F., AUDREY, G. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal Reproduction Science*, 129(1), pp.44-49.
- MERINO, O., AGUAGÜIÑA, W., ESPONDA, P., RISOPATRON, P., ISACHENKO, E., ISACHENKO, V., SÁNCHEZ, R. (2014) Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved. *Journal of Andrology*, pp. 1-8.
- MORALES, R., LLEDÓ, B., ORTIZ, J., RODRÍGUEZ-ARNEDO D., FABREGAT A., BERNABEU, R. (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicancia en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 24(5), pp.305-313.
- PAPARELLA, C., PAVESI, A., FELDMAN, R., BOUVET, B. (2015). Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Arch. Med Int.*, 37 (1), pp.07-14.
- QUINTERO, G., BERMÚDEZ R., CASTILLO, J. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: Un problema actual. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), pp.144-151.
- ROCA, J., GIL, A., HERNANDEZ, M., PARRILLA, I., VAZQUEZ, M., MARTINEZ, A. (2004) Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxyl toluene. *J Androl*, 25(2), pp.397–405.

- ROSSATO, M., ZORZI, M., FERLIN, A., GAROLLA, A., FORESTA, C. (2000). Effects of cryopreservation on progesterone • induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15(8):1739-43.
- RUIZ, E. (2018). Protocolos de Andrología. *Editorial Médica Panamericana*, 2da edición.
- SÁNCHEZ, R., ISACHENKO, V., PETRUNKINA, A., RISOPATRON, J., SCHULZ, M., ISACHENKO, E. (2012). Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. *J Androl*, 33(1), pp.559–562.
- SÁNCHEZ, R., SCHULZA, M., RISOPATRÓNA, J., ISACHENKO, V., ISACHENKO, E. (2013). Vitrificación de espermatozoides: una alternativa a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en pacientes con oligoastenozoospermia severa. *Rev Int Androl.*, 11(1), pp.36-39
- SIES, H. (1991). Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *American Journal of Medicine*, 91(3), pp.31-38.
- SHERMAN, J. (1973). Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertil Steril* 24, pp. 397–412
- SHOAE, A.; ZAMIRI, M. J. (2008). Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science*, 104, pp.414-418.
- TATONE, C., DI EMIDIO, G., VENTO, M., CIRIMINNA, R., ARTINI, P. (2010). Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol.* 26(2) pp. 563-567.
- TREMELLEN, K. (2008). Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Upd*, 14(1) pp. 243-258.

- WATSON, P., ANDERSON, W. (1983). Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J Reprod Fertil*, 69 (1), pp. 229–235.
- WEIN, A., KAVOUSSI, L., NOVICK, A., PARTIN, A., PETERS, G. (2015). Campbell / Walsh. Urología. *Editorial Medica Panamericana*, 10ma edición.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (2010). Laboratory Manual for the examination and processing of human semen and semen-cervical mucus interaction. *Cambridge University*.

ANEXOS

TABLA 1. PARAMETROS PARA MEDIR LA CONCENTRACIÓN DEL SEMEN HUMANO

Spz por campo de 400X	Dilución (Semen+Diluyente)
<15	1:5 (1+4) $(\frac{10ul}{semen} + \frac{40ul}{dilutor})$
15-40	1:10 (1+9) $(\frac{10ul}{semen} + \frac{90ul}{dilutor})$
40-200	1:20 (1+9) $(\frac{5ul}{semen} + \frac{95ul}{dilutor})$
>200	1:50 (1+49) $(\frac{5ul}{semen} + \frac{245ul}{dilutor})$

TABLA 2. CLASIFICACION DEL ESTRÉS OXIDATIVO SEGÚN EL KIT OXISPERM

Clasificación	Grado de oxidación	Color
N1	Muy bajo	Blanco
N2	Normal	Rosa
N3	Moderado	Lila
N4	Alto	Morado

TABLA 3. VALORES DE REFERENCIA DE CADA UNA DE LAS DISTINTAS VARIABLES SEMINALES SEGÚN LA OMS DEL 2010

Variable seminal	Valor de referencia
Volumen	1,5 (1,4 - 1,7)
pH	≥ 7,2
Concentración de espermatozoides (10 ⁶ por eyaculado)	15 (12-16)
Número total de espermatozoides (10 ⁶ por eyaculado)	39 (33-46)
Motilidad (tipo a + b)	32 (31-34)
Morfología espermática	≥ 4

TABLA 4. COMPARACION DE LA MEDIA Y DS ENTRE LOS PARAMETROS DE EVALUACION EN SEMEN FRESCO.

	N	Rango	Mínimo	Maximo	Media	Desv. típ.
pH	20	1.0	7.2	8.2	7.565	.3100
VOLUMEN	20	1.0	1.5	2.5	2.000	.2575
TEST ANION SUPEROXIDO	20	2	1	3	2.25	.639
CONTEO LEUCOCITOS (x10 ⁶)	20	.64	.43	1.07	.7305	.19597
CONCENTRACION FRESCO (x 10 ⁶)	20	31.74	63.22	94.96	84.3935	8.82420
MORFOLOGIA	20	15.30	9.15	24.45	16.2360	4.70830
N válido (según lista)	20					

TABLA 5. COMPARACION DE LA MEDIA Y DS ENTRE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN, VITALIDAD Y FRAGMENTACIÓN DE ADN SOBRE LOS TRATAMIENTOS CON BHT

MEDIA/DS	CONCENTRACION	VITALIDAD	FRAGMENTACION ADN
FRESCO	56.738 ± 4.61063	57.9450 ± 2.70825	—————
CAPACITADO	90.4590 ± 2.00303	91.7575 ± 1.92171	13.19 ± 1.58864
CONTROL	57.5825 ± .2.74974	59.1650 ± 3.16460	20.9785 ± 0.52311
T1	37.7880 ± .2.74685	42.7210 ± 1.37570	19.778 ± 0.85471
T2	60.2950 ± 4.10270	64.5845 ± 2.06422	14.3235 ± 0.98687
T3	43.8155 ± 1.87652	42.7365 ± 1.38523	21.329 ± 0.56416
T4	34.1895 ± 2.21022	31.0895 ± 1.27587	21.9165 ± 1.08997

TABLA 6. EFECTO DEL BHT EN RELACION A LA MOTILIDAD PROGRESIVA ESPERMÁTICA

Estadísticos descriptivos

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
MOTILIDAD EN FRESCO	20	16.07	50.09	66.16	56.7380	4.61063
MOTILIDAD CAPACITADO	20	7.37	85.84	93.21	90.4590	2.00303
MOTILIDAD CONTROL	20	8.24	52.86	61.10	57.5825	2.74974
MOTILIDAD T1	20	11.42	32.00	43.42	37.7880	2.74685
MOTILIDAD T2	20	16.32	50.41	66.73	60.2950	4.10270
MOTILIDAD T3	20	5.95	41.25	47.20	43.8155	1.87652
MOTILIDAD T4	20	7.61	30.94	38.55	34.1895	2.21022
N válido (según lista)	20					

GRAFICO 1. EFECTO DE LA ADICION DEL BHT A LOS TRATAMIENTOS CON RESPECTO A LA MOTILIDAD PROGRESIVA ESPERMÁTICA

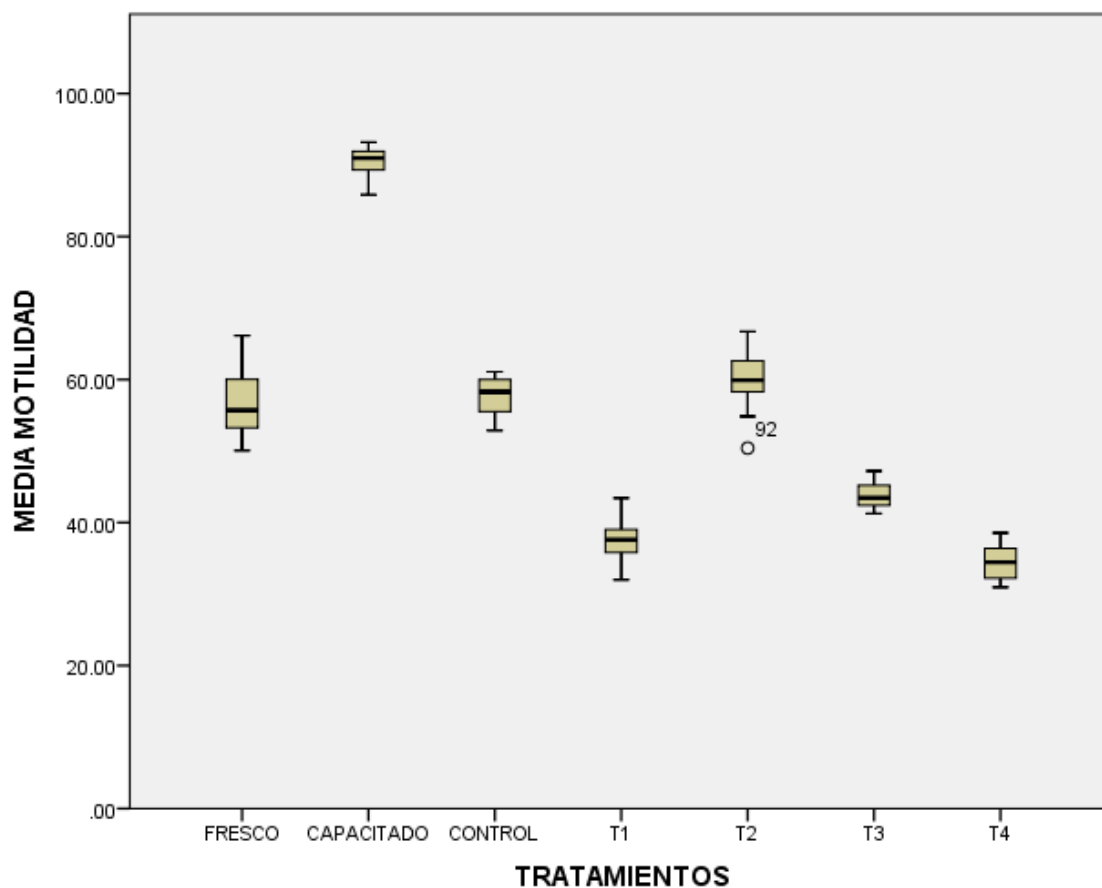


TABLA 7. EFECTO DEL BHT CON LA VITALIDAD ESPERMÁTICA

Estadísticos descriptivos

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
VITALIDAD FRESCO	20	10.68	51.21	61.89	57.9450	2.70825
VITALIDAD CAPACITADO	20	6.02	88.66	94.68	91.7575	1.92171
VITALIDAD CONTROL	20	12.41	51.97	64.38	59.1650	3.16460
VITALIDAD T1	20	5.40	39.59	44.99	42.7210	1.37570
VITALIDAD T2	20	8.10	59.89	67.99	64.5845	2.06422
VITALIDAD T3	20	5.33	40.60	45.93	42.7365	1.38523
VITALIDAD T4	20	4.36	29.07	33.43	31.0895	1.27587
N válido (según lista)	20					

GRAFICO 2. EFECTO DE LA ADICION DEL BHT A LOS TRATAMIENTOS RESPECTO A LA VITALIDAD ESPERMATICA

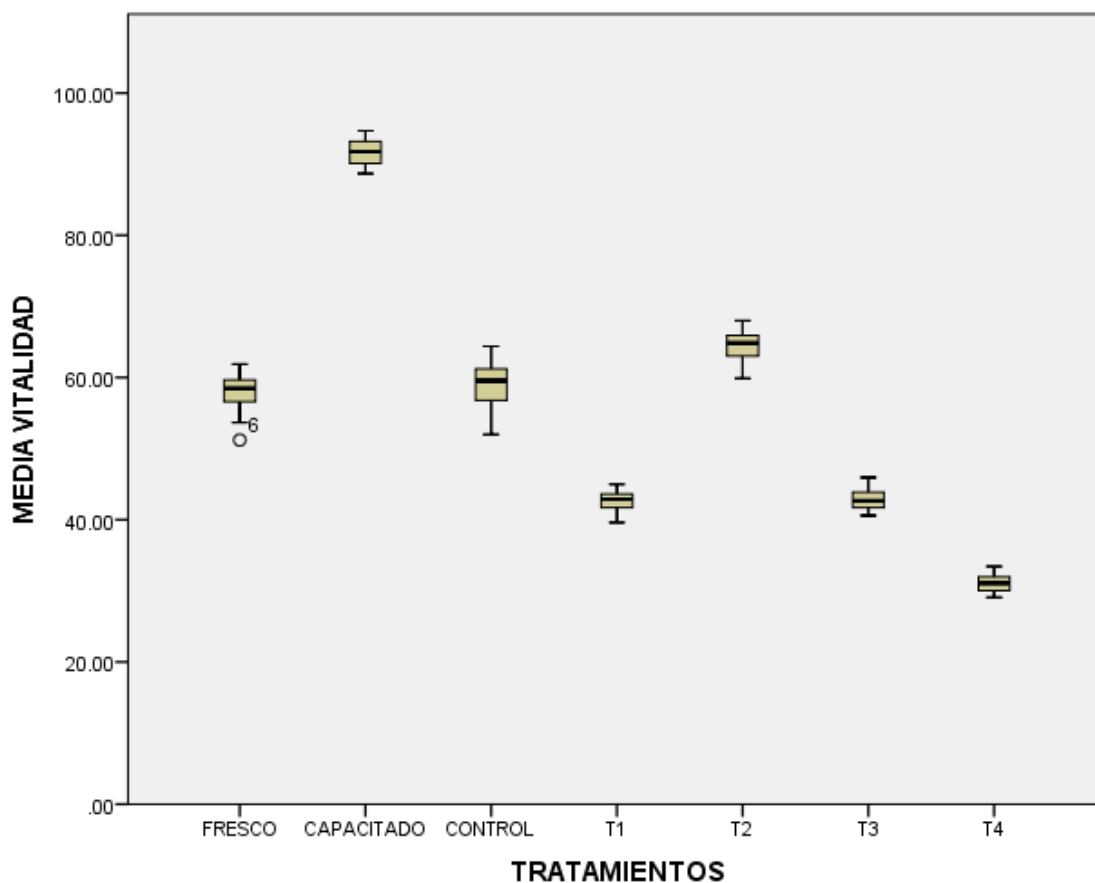


TABLA 8. EFECTO DEL BHT CON LA FRAGMENTACION DE ADN ESPERMATICO

Estadísticos descriptivos

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
FRAGMENTACION CAPACITADO	20	5.45	10.38	15.83	13.1900	1.58864
FRAGMENTACION CONTROL	20	2.16	19.80	21.96	20.9785	.52311
FRAGMENTACION T1	20	2.93	18.29	21.22	19.7780	.85471
FRAGMENTACION T2	20	3.45	12.87	16.32	14.3235	.98687
FRAGMENTACION T3	20	2.20	20.08	22.28	21.3290	.56416
FRAGMENTACION T4	20	4.05	19.20	23.25	21.9165	1.08997
N válido (según lista)	20					

GRAFICO 3. EFECTO DE LA ADICION DEL BHT A LOS TRATAMIENTOS RESPECTO A LA FRAGMENTACION DE ADN ESPERMÁTICO

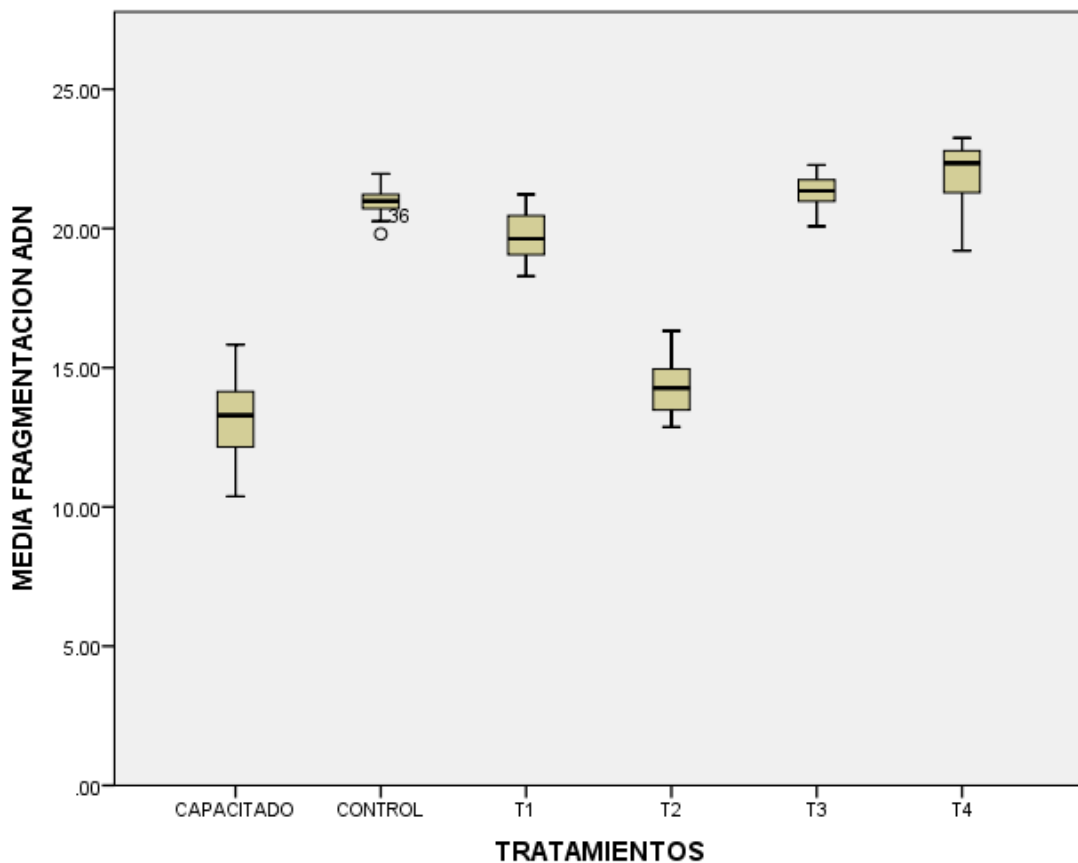


FIGURA 1. EVALUACION DE LA MOTILIDAD ESPERAMATICA 40X



FIGURA 2. EVALUACION DE LA VITALIDAD ESPERMÁTICA 40X

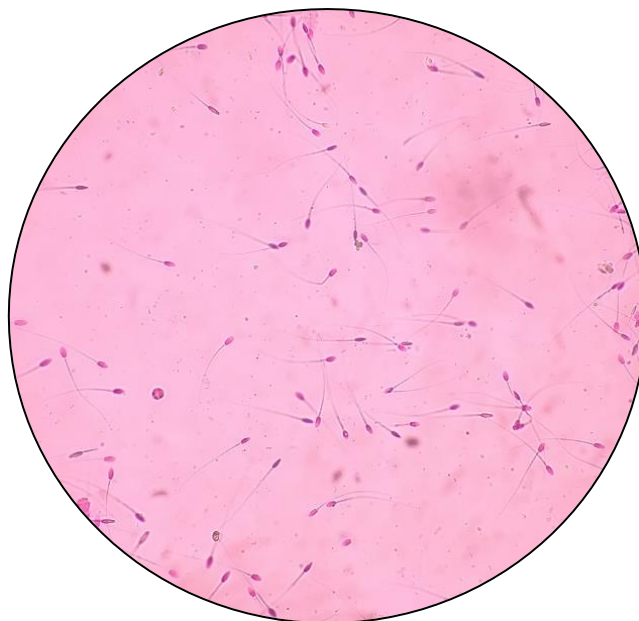


FIGURA 3. FRAGMENTACION DE ADN 100X

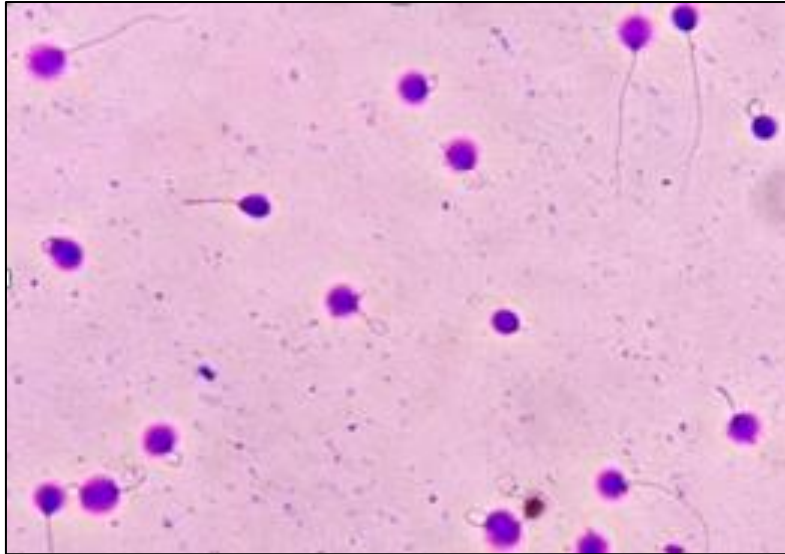
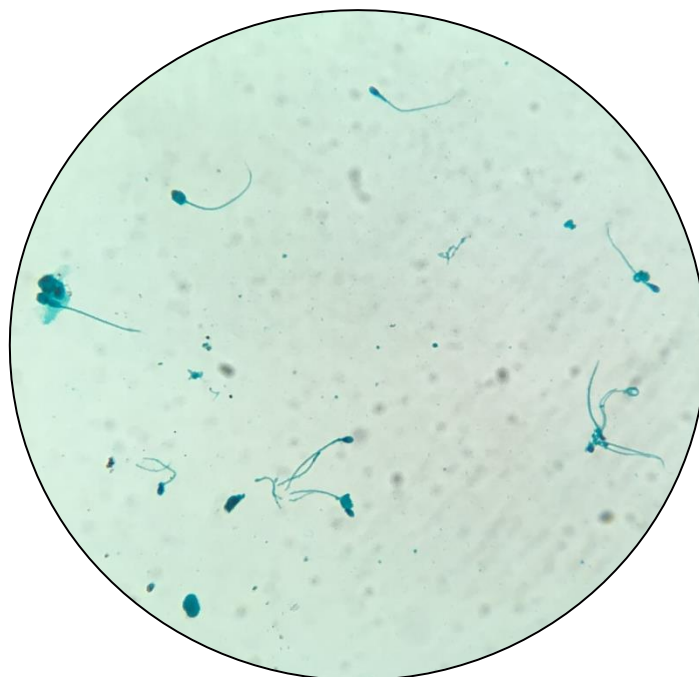


FIGURA 4. EVALUACION DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA 100X





**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de Tesis: Efecto antioxidante del butilhidroxitolueno sobre la función espermática en semen humano criopreservado mediante la técnica de vitrificación.

Presentado por: Bachiller Maria Claudia Sandoval Angeles

Asesor: Mg. H. Mauricio Gonzales Molfino

El propósito de la investigación es determinar el efecto antioxidante del Butilhidroxitolueno, un análogo sintético de la vitamina E, sobre la función espermática en semen humano criopreservado mediante la técnica de vitrificación. Lo invito a participar voluntariamente a esta investigación y cualquier duda al respecto conversar con mi persona.

Esta investigación incluye un análisis de espermatoograma convencional y test de fragmentación de ADN, como parte de la rutina de evaluación de fertilidad, se le indicara lo necesario para el procedimiento de la toma de muestra. Nosotros no compartiremos la identidad de aquellos que participen en la investigación. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. El conocimiento que obtenga por realizar esta investigación se compartirá con usted antes de que se haga con el público.

Esto es una reconfirmación de que la participación es voluntaria e incluye el derecho a retirarse.

He leído la información necesaria. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que se me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Nombre del participante: _____

Fecha: _____

Firma del tesista

Firma del participante

FORMATO DE RECEPCIÓN DE MUESTRA

NOMBRE DONANTE				Edad			
FECHA			Hora de Emisión				
DÍAS DE ABSTINENCIA			Hora de Evaluación				
COLECCIÓN (Marcar)	Laboratorio	Casa					
DATOS MACROSCOPICOS			DATOS MICROSCOPICOS				
APARIENCIA			CONCENTRACIÓN x 10 ⁶ /ml				
LICUEFACCIÓN			N.º TOTAL DE ESP x 10 ⁶ /ml				
VISCOSIDAD			MOTILIDAD (%)	(P) Progresiva Móvil			
pH				(NP) No Progresiva Móvil			
VOLUMEN				(I) Inmóvil			
			MORFOLOGÍA (%)	Normal			
				Anormal			
					Cabeza		
					Pieza Intermedia		
					Cola		
					VITALIDAD (%)	(V) Vivos	
						(NV) No vivos	
					TEST DE FRAGMENTACION DE ADN (%)	Halo Grande	
						Halo Mediano	
						Halo Pequeño	
			Sin Halo				
			Degradado				
			CELULAS REDONDAS				
OBSERVACIONES							