

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EFFECTO ANTIOXIDANTE DE FLOROGLUCINOL EN LA
CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS**

JOSE LUIS LLANOS CARRILLO

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Asesor: Mg. Hugo Mauricio Gonzales Molfino

Lima, Perú

2021

DEDICATORIA

Esta investigación va dedicada a mis padres Luis Damian Llanos y Mory y Silvia Angelica Carrillo Peñaloza y a mis hermanos Roberto Llanos Carrillo y Cristina Llanos Carrillo por su paciencia, consejos y constante apoyo a todos mis proyectos y objetivos. También dedico este trabajo a mi amigo y compañero de investigación Yatsen Wong Alvaro por su constante guía, motivación y enseñanzas durante este y otros proyectos.

José Luis Llanos Carrillo

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mi amigo, mentor y asesor de tesis el Mg. Mauricio Gonzales Molfino por sus consejos, apoyo e infinita paciencia durante el desarrollo de este proyecto. También deseo agradecer a todas aquellas personas que me brindaron información, una palabra de aliento y motivación para terminar este trabajo de investigación, especialmente a Yat seng Wong, Andrea Laos Ayala y Adriana Castillo Chávez. Y por último agradezco al Laboratorio de Fisiología Animal de la Universidad Ricardo Palma y al Laboratorio de Andrología de la clínica Inmater por su confianza y por haber hecho posible el desarrollo y culminación de este proyecto.

José Luis Llanos Carrillo

RESUMEN

La criopreservación de espermatozoides humanos es una técnica ampliamente utilizada en los laboratorios de reproducción asistida para preservar la fertilidad de los pacientes que desean tener descendencia en el futuro, sin embargo, durante la congelación se produce una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno, que genera una serie de cambios oxidativos perjudiciales a nivel molecular, causando lesiones sobre los fosfolípidos de la membrana plasmática, enzimas, proteínas y ADN de los espermatozoides. En base a estas evidencias el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antioxidante de floroglucinol en la criopreservación de espermatozoides humanos y determinar su efecto sobre la motilidad, vitalidad y fragmentación de ADN. Las concentraciones de floroglucinol que fueron evaluadas fueron 5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$. En este trabajo se evidenció que floroglucinol mejora significativamente la motilidad espermática post descongelación a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.032$), sin embargo, inhibe la motilidad a concentraciones iguales o superiores a 25 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras congeladas con floroglucinol aumentaron ligeramente su viabilidad espermática post descongelación, pero el efecto no fue significativo ($p=0.31$), por otro lado, el porcentaje de espermatozoides que presentaron fragmentación de ADN disminuyó significativamente en todas las concentraciones de floroglucinol, 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0.01$), 25 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0.0006$) y 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0.003$) en comparación al control (0 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados sugieren que suplementar el medio de criopreservación con floroglucinol disminuye el estrés oxidativo producido durante la criopreservación de espermatozoides humanos.

Palabras clave: Espermatozoides humanos, criopreservación, ROS, antioxidantes, floroglucinol, motilidad, vitalidad, fragmentación de ADN.

ABSTRACT

Cryopreservation of human sperm is a technique widely used in assisted reproduction laboratories to preserve the fertility of patients who wish to have offspring in the future, however, during freezing a greater amount of reactive oxygen species is produced, which generates a series of damaging oxidative changes at the molecular level, causing damage to the phospholipids of the plasma membrane, enzymes, proteins and DNA of sperm. Based on these evidences, the objective of this work was to evaluate the antioxidant effect of phloroglucinol in the cryopreservation of human sperm and to determine its effect on motility, vitality and DNA fragmentation. The concentrations of floroglucinol that were evaluated were 5 µg/mL, 25 µg/mL and 50 µg/mL. In this work it was evidenced that floroglucinol significantly improve post-thaw sperm motility at a concentration of 5 µg/mL ($p = 0.032$), however, it inhibits motility at concentrations equal to or greater than 25 µg/mL. The samples frozen with floroglucinol slightly increased their post-thaw sperm viability, but the effect was not significant ($p = 0.31$), on the other hand, the percentage of sperm that presented DNA fragmentation decreased significantly in all concentrations of floroglucinol, 5 µg/mL ($p = 0.01$), 25 µg/mL ($p = 0.0006$) and 50 µg/mL ($p = 0.003$) compared to the control (0 µg/mL). These results suggest that supplementing the cryopreservation medium with phloroglucinol decrease the oxidative stress produced during the cryopreservation of human sperm. Keywords: Human sperm, cryopreservation, ROS, antioxidants, phloroglucinol, motility, vitality, DNA fragmentation.

Keywords: Human sperm, cryopreservation, ROS, antioxidants, phloroglucinol, motility, vitality, DNA fragmentation.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.3	OBJETIVO GENERAL:.....	3
1.4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	3
II.	MARCO TEÓRICO	4
2.1	ESPERMATOZOIDE.....	4
2.1.1	CABEZA	4
2.1.2	FLAGELO	5
2.1.3	MEMBRANA PLASMÁTICA	6
2.2	FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA.....	7
2.2.1	MOTILIDAD	7
2.2.2	REACCIÓN ACROSOMAL.....	8
2.2.3	FECUNDACIÓN	8
2.3	SISTEMA ANTIOXIDANTE EN EL PLASMA SEMINAL	9
2.3.1	SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).....	9
2.3.2	GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX).....	9
2.3.3	CATALASA (CAT)	10
2.4	ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS EN EL PLASMA SEMINAL	10
2.4.1	VITAMINA C	10
2.4.2	VITAMINA E	10
2.4.3	GLUTATIONA (GSH)	11
2.5	ANTIOXIDANTES PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE	11
2.5.1	SOD	11
2.5.2	PEROXIRREDOXINA (PRDX).....	12
2.5.3	TIOREDOXINA (TRX).....	12
2.6	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL ESPERMATOZOIDE	12
2.6.1	LIPOPEROXIDACIÓN LIPÍDICA	13
2.6.2	FRAGMENTACIÓN DE ADN	14
2.7	CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.....	14
2.7.1	MEDIO DE CRIOPRESERVACIÓN.....	15
2.7.2	TASA DE CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO.....	15
2.7.3	DAÑOS SOBRE EL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN	15

III.	ANTECEDENTES	18
IV.	HIPÓTESIS.....	26
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	26
5.2	TIPO DE INVESTIGACIÓN	26
5.3	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	26
5.4	VARIABLES	27
5.4.1	VARIABLE INDEPENDIENTE	27
5.4.2	VARIABLES DEPENDIENTES	27
5.5	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	28
5.6	OBTENCIÓN DE MUESTRA	29
5.7	CRIOPRESERVACIÓN.....	29
5.8	DESCONGELACIÓN	30
5.9	ANÁLISIS DE LA CALIDAD SEMINAL.....	30
5.9.1	MOTILIDAD	30
5.9.2	VITALIDAD	30
5.9.3	MORFOLOGÍA	31
5.9.4	CONCENTRACIÓN.....	31
5.9.5	NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES POR EYACULADO.....	31
5.9.6	INTEGRIDAD DEL ADN	32
5.9.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
VI.	ASPECTO ÉTICO.....	33
VII.	RESULTADOS.....	33
7.1	PARÁMETROS SEMINALES POST DESCONGELACIÓN	33
7.1.1	MOTILIDAD ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN.....	33
7.1.2	FACTOR DE CRIOSUPERVIVENCIA.....	34
7.1.3	VITALIDAD ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN	34
7.1.4	INTEGRIDAD DEL ADN ESPERMTICO POST DESCONGELACIÓN	35
VIII.	DISCUSIÓN	35
IX.	CONCLUSIONES	38
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
	ANEXOS 1.....	51

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides es ampliamente utilizada en los tratamientos de reproducción asistida tanto en humanos, como en diferentes especies de animales. Esta técnica permite almacenar los gametos masculinos, por un periodo de tiempo indefinido, para posteriormente ser utilizada en un tratamiento de reproducción asistida, cuando el paciente desee tener descendencia.

El éxito de la criopreservación de espermatozoides se debe a varios factores como la tasa de congelamiento, la tasa de descongelamiento y los agentes crioprotectores utilizados en el medio de criopreservación; sin embargo, a pesar de utilizar protocolos estandarizados que deberían asegurar la supervivencia de los espermatozoides, la congelación causa daño a nivel molecular. Esto es provocado por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la criopreservación, que genera estrés oxidativo sobre ácidos grasos polinsaturados, aminoácidos y nucleótidos; dañando las diferentes estructuras del espermatozoide como la membrana celular y el ADN. Espermatozoides con este tipo de lesiones no son capaces de fecundar un ovocito u originan embriones subóptimos de mala calidad.

Desde hace varios años se han utilizado diferentes antioxidantes como la vitamina E, la vitamina C, resveratrol entre otros para prevenir el daño oxidativo generado durante la criopreservación de espermatozoides humanos. Los resultados de estas investigaciones muestran efectos positivos que mejoran la calidad seminal post descongelación, pero aún existen muchos antioxidantes que no han sido probados en la congelación de espermatozoides humanos como los polifenoles extraídos de las algas pardas.

El floroglucinol es una molécula polifenólica, con capacidad antioxidante, extraída principalmente de las algas pardas de la clase Phaeophyceae, esta molécula puede proteger a las células del estrés oxidativo generado por ROS como el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo e incrementa la actividad de ciertas enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Además, es capaz de mejorar la concentración de testosterona, la concentración espermática y el comportamiento sexual en ratones diabéticos con disfunción sexual. El objetivo de este

trabajo es evaluar el efecto antioxidante de floroglucinol sobre la criopreservación de espermatozoides humanos.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infertilidad es una enfermedad multifactorial que se origina a diferentes niveles del sistema reproductivo humano y es un problema que afecta al 15% de las parejas a nivel mundial. Los varones solo son responsables del 20-30% de los casos de infertilidad, mientras que el 50% de los casos se debe solo a factores femeninos y un 20-30% de los casos de infertilidad son por ambos factores (Agarwal et al., 2015).

En los últimos años el número de parejas que se someten a tratamientos de reproducción asistida ha ido en aumento en Latinoamérica; en el 2014 se realizaron 65,534 ciclos (Zegers-Hochschild et al., 2017) y en el 2015 se realizaron 75,121 ciclos (Zegers-Hochschild et al., 2019b), sin embargo, el éxito de los tratamientos de reproducción asistida, medido como la tasa de nacido vivo por transferencia, aún sigue siendo aproximadamente de un 30% en Latinoamérica, es decir, de cada 10 transferencias embrionarias solo 3 logran ser exitosas (Zegers-Hochschild et al., 2019a). Esta baja tasa de éxito en los tratamientos de reproducción asistida puede deberse a que faltan mejorar algunos factores concernientes a las condiciones, medios y técnicas utilizadas en los ciclos de fecundación *in vitro*, así como la estimulación ovárica, la selección de gametos, preservación de gametos y medios de cultivo embrionario.

Dentro de la preservación de gametos, la criopreservación de espermatozoides humanos aun presenta inconvenientes; esta técnica no asegura la completa integridad de los espermatozoides de una muestra seminal, en un tratamiento de reproducción asistida. Las bajas temperaturas generadas durante el proceso de congelación y el aumento en la concentración de ROS, afecta las diferentes estructuras de los espermatozoides, como su membrana plasmática, acrosoma, mitocondrias y material genético, que disminuye el potencial fértil del varón (Rozati et al., 2017; Wang et al., 1997). La motilidad progresiva presenta resultados subóptimos por debajo del 30% y la fragmentación de ADN aumenta en las muestras seminales post descongelación (Raad et al., 2018). En conjunto esto puede disminuir la tasa de fecundación y la tasa de blastulación por ovocito, además de generar

embriones de mala calidad, bajas tasas de implantación y aumento de pérdidas recurrentes (Borges et al., 2019; Luna et al., 2009).

1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La criopreservación de espermatozoides humanos permite preservar los gametos del varón durante un periodo de tiempo indefinido y puedan ser usados cuando se desee tener descendencia. La congelación asegura la presencia de espermatozoides en un tratamiento de reproducción asistida para realizar la fecundación de los ovocitos recuperados luego de una aspiración ovárica (Sharma et al., 2015).

Está indicada para varones que viajan por diversos motivos y no estarán presentes durante el tratamiento de reproducción asistida, en el caso de presentar cáncer testicular, en el caso de realizarse la vasectomía y se desea tener hijos en el futuro, para pacientes que han sufrido algún trauma a nivel testicular y para pacientes azoospermicos que presenten espermatozoides luego de una biopsia testicular. Además, puede ser utilizada para descartar la presencia de enfermedades de transmisión sexual en las muestras seminales que van a ser usadas en ciclos de fecundación in vitro (S. Gupta et al., 2018).

Como se menciona anteriormente la criopreservación de espermatozoides humanos es una herramienta útil en los tratamientos de reproducción asistida y por eso es necesario realizar investigaciones para mejorar los protocolos y medios de congelación. Estas mejoras deberían asegurar la integridad del genoma paterno de los espermatozoides descongelados y el desarrollo de un embrión, hasta generar un recién nacido con buen estado de salud. Esta investigación tiene como objetivo evaluar floroglucinol como elemento antioxidante en la congelación de espermatozoides humanos.

1.3 OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el efecto antioxidante de floroglucinol sobre la criopreservación de espermatozoides humanos.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analizar el efecto, de las concentraciones, de 5, 25 y 50 µg/mL de floroglucinol sobre la motilidad y vitalidad espermática post descongelación.

- Determinar la integridad del ADN espermático post descongelación en concentraciones de 5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de floroglucinol.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides son células haploides especializadas, que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos, a través de un proceso denominado espermatogénesis que consiste de tres etapas: mitosis, meiosis y espermiogénesis, que dura aproximadamente entre 42 y 76 días (Neto et al., 2016). Posteriormente los espermatozoides se trasladan a través de la rete testis y los conductos eferentes hacia el epidídimo, donde terminan de madurar y adquieren su capacidad motil en 4 días (Sullivan & Mieusset, 2016). El espermatozoide está formado básicamente por tres regiones, la cabeza, el cuello y el flagelo, rodeados por la membrana plasmática. A continuación, se detalla la estructura espermática.

2.1.1 CABEZA

La cabeza del espermatozoide es una estructura que tiene forma oval y mide aproximadamente entre 3.7 - 4.7 μm de longitud y 2.5 - 3.2 μm de ancho por 1.5 μm de espesor. La razón entre la longitud y el ancho va de 1.3 a 1.8 μm . En esta zona se encuentran el núcleo, el acrosoma y la gran mayoría del escaso citoplasma presente en el espermatozoide (Jequier, 2000; López García et al., 2012).

2.1.1.1 ACROSOMA

El acrosoma es una organela localizada en la cabeza del espermatozoide, que se forma a partir del aparato de Golgi durante la espermiogénesis, y abarca aproximadamente un 40 – 70 % del volumen de la cabeza (Silber, 2018). Es una estructura en forma de saco o capuchón, que está rodeada por dos membranas, una interna y otra externa. En su interior presenta un pH ácido y almacena diferentes enzimas como hialuronidasa, glucuronidasa y acrosina (G. S. Gupta, 2005).

Delimita la cabeza en dos regiones: La región anterior (acrosomal) que participa en la reacción acrosomal y la región post acrosomal (ecuatorial). En el segmento ecuatorial y en el vaina post acrosomal se ha identificado a la fosfolipasa c zeta involucrada en la activación del ovocito durante la fecundación (Saleh et al., 2020).

2.1.1.2 NÚCLEO

El núcleo es una masa compacta de ADN (Ácido desoxirribonucleico) que está rodeada por una membrana doble (membrana nuclear). El ADN nuclear está fuertemente empaquetado en forma toroidal por protaminas (proteínas) que se unen al surco mayor del ADN neutralizando su carga negativa (Shaman & Ward, 2006). Las protaminas empaquetan aproximadamente un 90 a 95 % de la cromatina espermática humana y el resto es empaquetado por histonas en forma de solenoides. Estas proteínas están compuestas por un alto contenido de arginina (48 % en espermatozoides humanos) que le confiere su característica carga positiva que permite su unión al grupo fosfato del ADN; también presenta residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro entre protaminas adyacentes y se unen a moléculas de zinc estabilizando la cromatina espermática (Oliva, 2006). Las regiones que presentan histonas son más susceptibles a daño por factores exógenos como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y endógenos como la enzima topoisomerasa 2 presente en los espermatozoides maduros (Dominguez et al., 2011).

2.1.2 FLAGELO

El flagelo mide aproximadamente entre 45 μm – 50 μm de longitud y está compuesto por cuatro estructuras, el cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza final.

El cuello es la parte del flagelo que contiene a la pieza de conexión, que es una estructura formada por el capitelo y los segmentos o columnas estriadas, que están constituidos por proteína fibrosa. En la fosa de implantación el capitelo se inserta a la cabeza, uniéndose a la placa basal de la membrana nuclear, mientras que las columnas estriadas forman la bóveda del centriolo proximal y se unen distalmente a las fibras densas exteriores (Fawcett, 1970; Ounjai et al., 2012).

La pieza media del flagelo está compuesta de afuera hacia dentro por la vaina mitocondrial, nueve fibras densas y por el axonema. La vaina mitocondrial es la encargada de proporcionar la energía necesaria para el movimiento flagelar, mientras que

las fibras densas refuerzan la estructura del flagelo. El axonema está formado por nueve pares de microtúbulos exteriores y un par central (9 + 2), que se originan a partir del centriolo distal durante la espermiogénesis y es la estructura que produce el movimiento flagelar. Los pares periféricos se unen por puentes de nexina y estos a su vez se unen al par central a través de radios radiales, cada par de microtúbulos exteriores presenta un brazo de dineína externo y un brazo interno, que ejercen una fuerza motora sobre los microtúbulos y las otras estructuras del flagelo para generar la onda flagelar (Gaffney et al., 2011).

La pieza principal abarca dos tercios de la longitud del flagelo. Está compuesto por la vaina fibrosa, por 7 fibras densas exteriores y por el axonema. La vaina fibrosa es una estructura que está formada por dos columnas longitudinales, que se unen a anillos denominados costillas transversales. La última parte del flagelo es la pieza final y está compuesto solo por el axonema rodeado por la membrana plasmática (Turner, 2006).

2.1.3 MEMBRANA PLASMÁTICA

La membrana plasmática de los espermatozoides está compuesta por fosfolípidos, colesterol y un gran porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, aproximadamente entre 36 y 52 % del total ácidos grasos presentes en el espermatozoide. Los ácidos grasos poliinsaturados proporcionan fluidez y flexibilidad a la membrana espermática (Lenzi et al., 1996; N. M. Gulaya, V. M. Margitich, 2001).

El espermatozoide como todas las células somáticas presenta un revestimiento de glicoconjugados en la parte externa de la membrana plasmática, está cubierta mide entre 20 y 60 nm de espesor y lo conforman diferentes tipos de glicoproteínas, glicolípidos y proteínas ancladas a glicosilfosfatidil inositol. Está cubierta es denominada glucocálix y participa en diferentes funciones espermáticas como la capacidad de pasar el moco cervical, atravesar las células del cumulo del ovocito, inhibir la reacción acrosomal y proteger al espermatozoide de la respuesta inmune humoral y celular en el útero (Schröter et al., 1999; Tecle & Gagneux, 2015).

En la membrana plasmática existen diferentes proteínas que están involucradas en la capacidad que tiene el espermatozoide para atravesar las diferentes capas que protegen al ovocito y fusionarse con su membrana plasmática. Entre estas proteínas tenemos a PH-20, CRISP1, Zonadhesina e IZUMO. Se cree que cada una de estas moléculas cumplen

una función importante en la unión del espermatozoide con el ovocito sin embargo aún falta profundizar en sus mecanismos de acción (Springate & Frasier, 2017).

2.2 FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA

El espermatozoide tiene la función de llevar el genoma paterno a través del tracto reproductivo femenino hasta el oviducto, donde la fecundación se lleva a cabo. Durante su desplazamiento el espermatozoide sufre cambios, como la adquisición de la motilidad hiperactividad y la reacción acrosomal (capacitación espermática) para poder atravesar las barreras que protegen al ovocito.

2.2.1 MOTILIDAD

Los espermatozoides adquieren la capacidad de mover su flagelo durante su almacenamiento en la cauda del epidídimo. Durante su viaje a través del tracto reproductivo femenino, el espermatozoide adquiere dos tipos de motilidad, la motilidad activa que genera una onda flagelar de baja amplitud y la motilidad hiperactiva que genera una onda mayor amplitud. La motilidad activa se origina en el momento que los espermatozoides son depositados en la vagina, mientras que la hiperactiva, cuando el espermatozoide se encuentra en el oviducto. El axonema es la estructura que genera el movimiento flagelar, cuando sus dos brazos de dineína son fosforilados y se activa la dineína ATPasa que hidroliza ATP. La hidrólisis de ATP libera energía que es convertida en fuerza y permite que las dineínas se unan al par de microtubos adyacentes deslizándolo hacia arriba, los microtúbulos al estar unidos a la cabeza traducen el deslizamiento en la curvatura del flagelo (Turner, 2006).

El movimiento flagelar puede estar regulado por diferentes vías de señalización, pero se han descrito dos vías principales que consisten en una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones que activan o desactivan proteínas involucradas en el movimiento flagelar. La primera vía es la que consiste en la desactivación de PPP1 (fosfoproteína fosfatasa 1), una proteína que inhibe motilidad, esta vía de señalización es dependiente de la concentración de calcio intracelular y está asociada a la motilidad activa. La segunda vía de señalización, implicada en la motilidad hiperactiva, es la vía sAC (Adenil ciclasa soluble) / cAMP (Adenosín monofosfato cíclico) / PKA (proteína Kinasa A) que es

dependiente de la concentración de calcio y bicarbonato (Freitas et al., 2016). La concentración de calcio intracelular es regulada por la actividad de la enzima Ca^{+2} ATPasa presente en la membrana plasmática del espermatozoide.

2.2.2 REACCIÓN ACROSOMAL

La reacción acrosomal es un proceso que se lleva a cabo cuando el espermatozoide se une a la zona pelúcida del ovocito. El acrosoma reaccionado libera una serie de enzimas como hialuronidasa y acrosina que ablandan la zona pelúcida, para poder ser atravesado por el espermatozoide y fecundar el ovocito. Este proceso es caracterizado por la liberación de colesterol, que disminuye la rigidez de la membrana plasmática y acrosomal, permitiendo la redistribución de sus fosfolípidos. La falta de rigidez permite la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. Estos cambios en la membrana del espermatozoide producen un aumento en la concentración de calcio, bicarbonato y pH que conlleva a la activación de vías de señalización como cAMP / PKA. Fisiológicamente estos cambios son inducidos por diferentes moléculas como progesterona, GABA (ácido gamma butírico) y la proteína de la zona pelúcida ZP3 (Del Río et al., 2007; Patrat et al., 2000).

2.2.3 FECUNDACIÓN

Antes de que el espermatozoide pueda fusionarse con el ovocito tiene que atravesar las diferentes barreras que protegen al gameto femenino, la primera barrera es la matriz mucilaginoso formada por hialuronato, que es secretada por las células del cúmulo. Esta barrera es atravesada por el espermatozoide gracias a que presenta una enzima tipo hialuronidasa en la parte apical del cabeza (PH-20). La segunda barrera es la zona pelúcida conformada por oligosacáridos y glucoproteínas, además de las proteínas de unión al espermatozoide denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4. ZP3 es la responsable de adherirse a la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide e inducir la reacción acrosomal para que el espermatozoide pueda atravesar la zona pelúcida (Springate & Frasier, 2017).

Después que el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida, la membrana de la región ecuatorial del espermatozoide toma contacto con la membrana plasmática del ovocito y comienzan a fusionarse. La fusión es mediada por diferentes proteínas presentes en la

superficie de la región ecuatorial del espermatozoide como PH-30, CRISP1, PLA2 e IZUMO. IZUMO es el mediador principal de esta interacción y se une a JUNO en la superficie de la membrana plasmática del ovocito. Posterior a la fusión del espermatozoide con el ovocito, la fosfolipasa C zeta presente en la región post acrosomal del espermatozoide, induce la cascada de calcio, que es necesaria para activar el ovocito y mediar la reacción cortical, el término de la meiosis y la formación de los pronúcleos (Georgadaki et al., 2016).

2.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE EN EL PLASMA SEMINAL

El plasma seminal presenta un sistema de defensa que protege a los espermatozoides de la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este mecanismo está conformado por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los principales antioxidantes enzimáticos en el plasma seminal son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH); además existe una gran variedad de antioxidantes no enzimáticos como la vitamina E, la vitamina C y glutatión (Hammadeh et al., 2009).

2.3.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Las superóxidos dismutasas (SODs) son un grupo de metaloenzimas que se encuentran en diferentes tejidos, sustancias y compartimentos subcelulares del cuerpo; para proteger a las células del estrés oxidativo producido por el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Estas enzimas catalizan la dismutación del radical superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Petersen et al., 2018). Las principales superóxidos dismutasas presentes en el plasma seminal son la Cu-Zn-SOD y la EC-SOD, que aportan aproximadamente un 75% y 25% de la actividad antioxidante de la SOD en el plasma seminal respectivamente (Peeker, 1997).

2.3.2 GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

Las glutatión peroxidasas (GPXs) son una familia de enzimas conocidas por catalizar la reducción de H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos en compuestos inofensivos para la célula (H_2O y O_2). Estas enzimas usan glutatión como agente reductor, en el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa (Khan & Gowder, 2014). Las principales GPXs presentes

en el tracto reproductivo masculino son la GPX3 en los conductos deferentes, GPX4 en el testículo y la GPX5 en el epidídimo (Drevet, 2006). En el plasma seminal la actividad enzimática de GPX es realizada principalmente por la isoenzima GPX3 (70-90%) (Giannattasio et al., 2002).

2.3.3 CATALASA (CAT)

La catalasa es una enzima (hemoproteína) conocida por descomponer millones de moléculas de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, para proteger a la célula de su efecto deletéreo (Goyal & Basak, 2010). La catalasa presente en el plasma seminal de los seres humanos es producida principalmente por la glándula prostática (Jeulin et al., 1989).

2.4 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS EN EL PLASMA SEMINAL

Son moléculas que generalmente se obtienen de la ingesta de diferentes alimentos y cumplen diferentes funciones, entre ellas las de proteger a las células del estrés oxidativo causado por ROS, cuando las enzimas antioxidantes no son suficientes para mediar su excesiva producción. Los principales antioxidantes no enzimáticos son la vitamina C, la vitamina E y la glutatona (Hammadeh et al., 2009).

2.4.1 VITAMINA C

La vitamina C (ácido ascórbico) es una lactona de seis carbonos, cuya capacidad antioxidante se debe a su capacidad de donar electrones (agente reductor) y neutralizar ROS como el ion superóxido, el radical hidroxilo y el radical peroxilo (Padayatty et al., 2003). Su mecanismo de acción consiste en reducir un radical libre potencialmente nocivo y formar un radical libre más estable y menos dañino (radical dehidroascórbico). La vitamina C se encuentra en mayor concentración en el plasma seminal que en la sangre y es secretado principalmente por la vesícula seminal (Das et al., 2009).

2.4.2 VITAMINA E

Alfa tocoferol es la principal vitamina E en los seres humanos, está formado por una larga cadena lateral isoprenoide unida en la posición dos a un anillo 6-cromanol (Rizvi et al., 2014). Es un potente antioxidante liposoluble que tiene la capacidad de interrumpir las reacciones en cadena generadas por ROS. Se almacena principalmente en las membranas

lipídicas de las células y protege a los ácidos grasos polinsaturados de la lipoperoxidación lipídica producida por el radical peroxilo (Traber & Atkinson, 2007). Cuando la vitamina E reduce al radical peroxilo esta se transforma en el radical tocoferoxilo que es más estable y posteriormente puede reaccionar con otro radical tocoferoxilo o ser reducido por la vitamina C o glutatona a vitamina E (Niki, 2015).

2.4.3 GLUTATIONA (GSH)

La glutatona reducida (GSH) es un tripéptido (γ -L-glutamyl-L-cisteinglicina), considerado como el más importante tiol de bajo peso molecular presente en las células, debido a su capacidad antioxidante. El grupo tiol (-SH) de la GSH está involucrado en reacciones de conjugación y reducción que le proporcionan su capacidad antioxidante para remover radicales libres y compuestos tóxicos (drogas y contaminantes) de forma directa o a través de catálisis enzimática: elimina directamente radicales libres como el radical hidroxilo y actúa como sustrato de GPX para eliminar H_2O_2 y lipoperóxidos (Forman et al., 2009; Gaucher et al., 2018). Durante la reducción del H_2O_2 se forma GSSG (glutatona oxidada) que es reducida a GSH por la enzima glutatión reductasa (Atig et al., 2012).

2.5 ANTIOXIDANTES PRESENTES EN EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula especializada con muy poco citoplasma, por lo tanto, los antioxidantes enzimáticos que se encuentran en el plasma seminal no están presentes o tienen una actividad enzimática marginal o casi nula en el citoplasma. A pesar de eso las células espermáticas presentan algunas enzimas antioxidantes como la SOD, peroxirredoxinas y tiorredoxinas que trabajan en conjunto para proteger la función espermática (O'Flaherty, 2014b).

2.5.1 SOD

Como se mencionó anteriormente las SODs catalizan la reducción del O_2^- en H_2O_2 y O_2 protegiendo a los espermatozoides de su efecto dañino. La actividad enzimática de la Cu-Zn-SOD (518 U/mg) en el citosol de los espermatozoides es elevada mientras que la actividad de Mn-SOD (2.4 U/mg) y EC-SOD (2.11 U/mg) son mínimas (Peeker, 1997).

2.5.2 PEROXIRREDOXINA (PRDX)

Las peroxirredoxinas (PRDXs) son una familia de peroxidases que presentan una cisteína en el extremo amino terminal de la molécula que sirve como sitio de oxidación para peróxidos. Estas enzimas se clasifican en seis isoformas (PRDX1- PRDX6) que catalizan la reducción del peróxido de hidrogeno, alquil hidroperóxidos y peroxinitrito (Rhee, 2016). Las peroxirredoxinas están presentes en todos los compartimientos intracelulares del espermatozoide desde la cabeza a la cola, incluyendo la membrana plasmática; son los principales antioxidantes presentes dentro del espermatozoide y lo protegen contra el efecto deletéreo del H₂O₂ y otras ROS (O'Flaherty, 2014a).

2.5.3 TIOREDOXINA (TRX)

Las tioredoxinas (TRXs) son una familia de reductasas que presentan dos residuos de cisteína en el sitio catalítico de la molécula, que están involucrados en la reducción de enlaces disulfuro de proteínas (Collet & Messens, 2010). La tioredoxinas reductasa mantiene el sitio activo de las TRXs en su forma reducida y activa (Lee et al., 2013). Existen tres tioredoxinas específicas en los espermatozoides maduros SPTRX1, SPTRX2 y SPTRX3 (Miranda-Vizueté et al., 2001) las cuales participan en el sistema tioredoxina/tioredoxina reductasa cuya función en el espermatozoide es mantener los niveles de PRDX reducida (O'Flaherty, 2014b).

2.6 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL ESPERMATOZOIDE

Un radical libre es una molécula muy reactiva, debido a que presentan un electrón desapareado en su última capa de valencia, que puede oxidar moléculas lipídicas, aminoácidos y nucleótidos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un grupo de moléculas que agrupa radicales libres como el ion superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo ([·]OH) y el radical peroxilo ([·]ROO⁻), así como también moléculas no radicales como el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y el ozono (Wagner et al., 2018).

Las ROS son generadas por el metabolismo celular del espermatozoide, este proceso es mediado por enzimas y compuestos como NADPH oxidasa en la membrana plasmática,

NADH dependiente de óxido reducción en la mitocondria y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en el citoplasma (Durairajanayagam, 2019).

En concentraciones adecuadas y controladas las ROS cumplen funciones fisiológicas dentro del espermatozoide y han sido asociadas a cascadas de señalización en la activación de la hiperactividad espermática, la reacción acrosomal y la fecundación. Las ROS pueden inducir la activación de la vía sAC / cAMP / PKA. Sin embargo, en condiciones patológicas las especies reactivas causan estrés oxidativo sobre el espermatozoide y pueden superar la capacidad antioxidante del plasma seminal y del citosol ocasionando lipoperoxidación lipídica y fragmentación de ADN en las células espermáticas (Dutta et al., 2019).

2.6.1 LIPOPEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La membrana plasmática del espermatozoide presenta altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, que contienen dobles enlaces, que son altamente susceptibles al ataque por ROS. El aumento de ROS dentro y fuera de la célula da lugar a lipoperoxidación lipídica (LPO) que puede causar disfunción espermática asociada con pérdida de la integridad y función de la membrana del espermatozoide (Sanocka & Kurpisz, 2004), afectando la motilidad, vitalidad, morfología y concentración espermática (Colagar et al., 2013; Mahran et al., 2013).

La LPO es una serie de reacciones químicas en cadena, producida por ROS, que dañan los ácidos grasos polinsaturados presentes en la membrana lipídica de las células (Dutta et al., 2019). El proceso de lipoperoxidación consiste en tres fases: la fase de iniciación, la fase de propagación y la fase de terminación. En la primera fase una especie oxidante como el radical hidroxilo abstrae un átomo de hidrógeno del grupo metileno de un ácido graso poliinsaturado, formando un radical lipídico. En la fase de propagación el radical lipídico reacciona con oxígeno formando un radical peroxilo que a su vez puede reaccionar con el grupo metileno de otro ácido graso polinsaturado formando otro radical lipídico y un hidroperóxido lipídico (reacción en cadena). En la última fase o de terminación un agente antioxidante como las vitamina E o C donan un átomo de hidrogeno al radical peroxilo formando una especie no radical (Ayala et al., 2014; Gaschler & Stockwell, 2017; Sanocka & Kurpisz, 2004)

2.6.2 FRAGMENTACIÓN DE ADN

Las roturas, cortes o lesiones en la cadena de ADN (ácido desoxirribonucleico) se conoce como fragmentación de ADN; estas lesiones pueden ocurrir en una sola cadena (rotura en una sola hebra de ADN) o en dos cadenas (rotura en las dos hebras de ADN) (González-Marín et al., 2012). Las principales causas de fragmentación de ADN en los espermatozoides son la apoptosis abortiva, el inapropiado empaquetamiento del ADN, quimioterapia, radioterapia, tóxicos ambientales, el estilo de vida y estrés oxidativo (Henkel & Franken, 2011).

La fragmentación de ADN es considerada un robusto indicador de estrés en los tratamientos de reproducción asistida. Elevados índices de fragmentación de ADN han sido asociados a abortos recurrentes, mala calidad embrionaria y arresto del desarrollo embrionario (Wright et al., 2014).

2.7 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

La criopreservación es una técnica que consiste en mantener las células o tejidos a bajas temperaturas (-196°C) para detener su metabolismo (estado de dormancia) y así prolongar su tiempo de vida. Es utilizada para preservar los gametos de diferentes grupos de mamíferos como ratones, cerdos, caballos, bovinos y úrsidos para mejorar su genética y producción, así como también con fines de preservación. En la especie humana es constantemente usada en varones, que por diferentes motivos preservan su fertilidad hasta el momento que deseen tener descendencia y también en los tratamientos de reproducción asistida de baja (inseminación intrauterina) y alta complejidad (fecundación in vitro). Es decir, la criopreservación asegura la disponibilidad de espermatozoides, para inseminar los ovocitos recuperados, en un tratamiento de reproducción asistida y evita que el paciente tenga que estar presente durante el tratamiento (Agca & Critser, 2002; Sharma *et al.*, 2015).

La técnica consiste en adicionar medio de criopreservación al semen en una proporción 1:1, gota a gota, y luego es colocada en un sistema de almacenamiento como pajillas o crioviales, que posteriormente son suspendidas en vapores de nitrógeno líquido a una temperatura entre -70°C y -80°C. Una vez congelada la muestra seminal es sumergida

en nitrógeno líquido (NL) a -196°C en un balón de almacenamiento (Nijs & Ombelet, 2001).

2.7.1 MEDIO DE CRIOPRESERVACIÓN

El medio de criopreservación que se utiliza en los espermatozoides humanos contiene glicerol como principal agente crioprotector intracelular, el cual evita la formación de cristales hielo extracelulares e intracelulares durante el proceso de congelación de las células espermáticas. En adición al glicerol, el medio crioprotector presenta agentes crioprotectores extracelulares, como sacarosa o trehalosa, que evita el shock osmótico generado sobre la membrana plasmática de los espermatozoides durante la salida de agua al medio extracelular y la entrada de glicerol a la célula (Mocé, E., Fajardo, A. J., & Graham, 2016).

2.7.2 TASA DE CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO

La tasa congelamiento y tasa de descongelamiento son factores importantes para asegurar un número adecuado de células vivas luego de la criopreservación. Los espermatozoides humanos presentan un buen porcentaje de espermatozoides vivos cuando son congelados a una tasa de congelamiento de -1°C a $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$; estas tasas de congelamiento son alcanzadas cuando la muestra seminal con medio crioprotector, es suspendida a temperaturas cercanas a -80°C durante 15 minutos (Di Santo et al., 2012). La descongelación generalmente se realiza utilizando tasas iguales o superiores a $400^{\circ}\text{C}/\text{min}$ colocando la muestra criopreservada a una temperatura entre 22°C y 37°C (Henry et al., 1993; Nijs & Ombelet, 2001).

2.7.3 DAÑOS SOBRE EL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN

Durante la criopreservación, el espermatozoide está expuesto a estrés osmótico, formación de cristales de hielo, citotoxicidad y estrés oxidativo que genera estrés físico y químico sobre el espermatozoide afectando su fisiología y supervivencia.

2.7.3.1 ESTRÉS OSMÓTICO

Cuando la muestra seminal se congela, el agua presente en el medio extracelular empieza a formar hielo y esto genera que los solutos disueltos se concentren, aumentando la osmolaridad del medio, provocando que los espermatozoides se deshidraten por osmosis. A tasas de congelación lentas el espermatozoide puede deshidratarse excesivamente y la membrana plasmática evita la pérdida excesiva de agua, produciéndose una resistencia física de la membrana a la pérdida de agua y si esta resistencia es excedida se producen lesiones y pérdida de fosfolípidos. La célula no debe sobrepasar el volumen mínimo de recuperación osmótica (Bjorndahl et al., 2010).

2.7.3.2 FORMACIÓN DE HIELO INTRACELULAR

La congelación forma cristales de hielo por un fenómeno denominada nucleación en el cual un cristal de hielo crece conforme disminuye la temperatura, el punto de solidificación del agua es de 0°C; sin embargo, cuando el medio presenta una gran cantidad de solutos la temperatura de solidificación y formación de cristales de hielo disminuye. Cuando las muestras seminales son congeladas a tasas rápidas el espermatozoide no se deshidrata adecuadamente y se forma cristales de hielo intracelulares que han sido asociadas a muerte celular (Palomar Rios & Molina Botella, 2019).

2.7.3.3 CITOXICIDAD DEL CRIOPROTECTOR

El glicerol puede ser citotóxico, pero a bajas temperaturas el metabolismo es lento y no causa daño al espermatozoide, sin embargo, a tasas de congelación demasiado lentas podría causar daños químicos dentro del espermatozoide debido a la exposición prolongada de la célula al crioprotector, por otro lado, cuando se descongela el espermatozoide es metabólicamente activo y el glicerol es tóxico. A concentraciones adecuadas de glicerol en el medio de criopreservación no ejerce un efecto citotóxico (S. Gupta et al., 2018).

2.7.3.4 ESTRÉS OXIDATIVO

La criopreservación aumenta la concentración de ROS como el ion superóxido y la pérdida en la actividad de algunas enzimas antioxidantes, como la glutatona y la superóxido dismutasa, provocando que el estrés oxidativo sobrepase la capacidad antioxidante de los espermatozoides (Alvarez & Storey, 1992; Chatterjee & Gagnon, 2001; Gadea et al., 2011). La producción de especies reactivas de oxígeno durante la criopreservación ha sido asociada al daño provocado sobre la membrana mitocondrial y la cadena transportadora de electrones, que originan la pérdida de fluidez de la membrana mitocondrial y la reducción del potencial de membrana mitocondrial, que a su vez estimularía la reducción del oxígeno en ion superóxido que luego será convertido en peróxido de hidrogeno y ion hidroxilo, siendo este último el más agresivo para la célula. La mitocondria es la principal fuente de ROS (Robert J. Aitken, 2017; Erdem Öztürk et al., 2019; Len et al., 2019).

El aumento de ROS ocasiona daño en la membrana plasmática del espermatozoide producido por lipoperoxidación lipídica, cambios en la expresión de proteínas y oxidación de nucleótidos, lo cual se traduce en pérdida de funcionalidad de la membrana plasmática, descenso en la viabilidad, menor porcentaje de espermatozoides motiles y en fragmentación de ADN, este último generado por interacción directa con ROS o por los productos tóxicos de la lipoperoxidación lipídica (malondialdehido, 4-hidroxynonenal, acroleína) (Hezavehei et al., 2018).

Concentraciones elevadas de ROS causan lipoperoxidación lipídica en la membrana plasmática y mitocondrial de los espermatozoides, amentando su fluidez y permeabilidad, que conlleva a un aumento del paso de iones del medio extracelular al citoplasma espermático, además también se produce pérdida de protones (H^+), electrones(e^-) y ATP a través de las membranas mitocondriales que se traduce en pérdida de motilidad espermática (R. Aitken et al., 2015; Nowicka-Bauer & Nixon, 2020). La motilidad también es afectada por los subproductos de la lipoperoxidación lipídica como 4-hidroxinonenal (4-HNE), malondialdehido (MDA) y acroleína que al ser moléculas electrofílicas pueden unirse a diferentes biomoléculas y enzimas de la cadena respiratoria de electrones (fosforilación oxidativa), que produce la fuga de electrones y agotamiento de ATP. El agotamiento de ATP puede dañar la función de las ATPasas de las dineínas del axonema. Por otro lado 4-HNE puede unirse a la cadena pesada de la dineína

inhibiendo su función. Los subproductos de la lipoperoxidación lipídica también pueden dañar el ADN espermático formando aductos con la cromatina espermática, produciendo su desestabilización y fragmentación de ADN (R. John Aitken et al., 2010; Villaverde et al., 2019).

Las ROS pueden afectar directamente la motilidad de los espermatozoides mediante la oxidación, glutationilación y nitrosilación de los grupos tiol de la alfa tubulina en el flagelo de los espermatozoides humanos y de las PRDX. También pueden dañar directamente el ADN espermático oxidando nucleósidos como guanosina (altamente susceptible a oxidación) produciendo 8-hidroxi-2' desoxiguanosina que a su vez puede producir sitios abásicos que conlleva a mutaciones y fragmentaciones (Robert J. Aitken, 2017; O'Flaherty & Matsushita-Fournier, 2017).

III. ANTECEDENTES

El descenso de la temperatura puede causar un incremento de ROS en las células espermáticas cuando son criopreservadas, como se puede observar en el trabajo de Wang y colaboradores en 1997, que reportaron que la actividad y concentración de ROS aumenta significativamente en un 40% aproximadamente durante la criopreservación de muestras seminales, cuando la temperatura disminuye de 37°C a 4°C. En sus resultados también se evidencia una pérdida significativa de la motilidad, vitalidad e integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides post descongelación que podría estar relacionado al estrés oxidativo (Wang et al., 1997).

La pérdida de motilidad y viabilidad durante la criopreservación también se ha reportado en otras investigaciones como la de Hallak y colaboradores en el 2000, donde congelaron espermatozoides humanos con dos medios de criopreservación, los cuales contenían glicerol y glicerol con yema de huevo, y reportaron que la motilidad podía disminuir hasta un 14% aproximadamente post descongelación y de forma similar la viabilidad evaluada con eosina-nigrosina (Hallak et al., 2000). Del mismo modo en el trabajo de Nijs & Ombelet en el 2001 y de Nallela y colaboradores en el 2004 se observó respectivamente que la motilidad y viabilidad post descongelación pueden disminuir por debajo del 50 % con respecto a muestras no congeladas, además, el porcentaje de espermatozoides con

morfología normal se ve afectado significativamente por la congelación (Nallella et al., 2004; Nijs & Ombelet, 2001).

Otro de los factores que sufre un efecto deletéreo durante la criopreservación, es el potencial de membrana mitocondrial, que disminuye durante la criopreservación y está relacionada a la pérdida de motilidad. O'Connell y colaboradores en el 2012, demuestra que la criopreservación afecta el potencial de membrana mitocondrial, medido como el consumo y actividad de rodamina 123, que disminuye en un 36% y 47% respectivamente, en espermatozoides descongelados. También se observa que la motilidad disminuye en las muestras seminales descongeladas en comparación al semen fresco (40.2% vs 24.8%) (O'Connell et al., 2002). Kotdawala y colaboradores en el 2012, también evidencian la pérdida de potencial mitocondrial post descongelación en muestras normozoospermicos y no normozoospermicos, en un 10% y 15% aproximadamente (Kotdawala et al., 2012).

El daño que sufre la mitocondria espermática durante la criopreservación ha sido asociada a una mayor producción de ROS durante el congelamiento (Erdem Öztürk et al., 2019) y la elevada producción de ROS como se ha descrito anteriormente puede generar lipoperoxidación lipídica, fragmentación y oxidación del ADN espermático.

La lipoperoxidación lipídica causada por una elevada concentración de ROS se ha evidenciado durante la criopreservación de espermatozoides y afecta la motilidad y viabilidad espermática. Garcés y colaboradores en el 2010 mostraron en sus resultados que la criopreservación aumenta la concentración de especies reactivas al ácido barbitúrico (malondialdehído) en comparación a muestras seminales frescas, en varones fértiles (2.56 nM vs 4.08 nM) e infértiles (4.08 nM vs 7.96 nM) (Garcez et al., 2010). De forma similar, Muñoz y colaboradores en el 2015 demostraron que el porcentaje de espermatozoides de caballo que producen una cantidad significativa de 4-HNE aumenta en muestras descongeladas (6.3% vs 2.7%) (Martin Muñoz et al., 2015).

Por otro lado, se ha observado que el porcentaje de espermatozoides, que presentan fragmentación y oxidación de ADN aumenta durante el proceso de congelación-descongelación. Lusignan y colaboradores en el 2018 muestran en sus resultados que el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN aumenta significativamente en muestras seminales congeladas con diferentes métodos y medios de criopreservación, determinado con TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferasa), en comparación a muestras frescas (12% vs 36% aprox.) (Lusignan et al., 2018). De forma análoga Raad y

colaboradores en el 2019 también describen en sus resultados un aumento de la fragmentación de ADN, evaluado con SCD (dispersión de la cromatina espermática), en muestras criopreservadas con diferentes medios comerciales (19.8% vs 21% aprox.) (Raad et al., 2018). La fragmentación de ADN espermático está relacionada con el desarrollo deficiente de embriones, bajas tasas de implantación y aumento de las tasas de abortos espontáneos (Borges et al., 2019).

Por otro parte, Zibri en el 2010 concluye que la criopreservación tiene un efecto deletéreo sobre el ADN espermático producido por oxidación, medido como el porcentaje de espermatozoides que presentan 8-oxoguanina, en muestras frescas y criopreservadas (14.5% vs 16.35%) y Thomson en el 2009 reporta que la fragmentación de ADN, de muestras criopreservadas, esta positivamente correlacionada con el porcentaje de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8OHdG) y concluye que la fragmentación de ADN está asociada al incremento de estrés oxidativo durante la criopreservación (Thomson et al., 2009; Zibri et al., 2012). Se ha descrito que las regiones del ADN espermático que están unidas a histonas son las más susceptibles a estrés oxidativo y que estas están asociadas a genes de importancia para el desarrollo temprano del embrión (Noblanc et al., 2013; Ward, 2010).

Las lesiones causadas en la cadena de ADN espermático durante la criopreservación podrían causar un efecto negativo en la fecundación y en el desarrollo embrionario como se observa en el trabajo de Luna y colaboradores en el 2009, que describen que la criopreservación afecta negativamente la capacidad de fecundación de los espermatozoides, en una fecundación in vitro convencional (FIV) y también describen que la tasa de fragmentación embrionaria aumenta cuando se utilizan muestras seminales criopreservadas. Hace poco en el 2019 Moreau y colaboradores demostraron que la presencia de fosfolipasa C zeta disminuye en espermatozoides criopreservados y Park en el 2015 observo que existe una asociación negativa entre la presencia de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina y fosfolipasa C zeta (Moreau et al., 2019; Park et al., 2015)

Desde la década de los 80 ya se utilizaban antioxidantes en los medios de criopreservación para disminuir el estrés oxidativo, ya que los espermatozoides inducidos a lipoperoxidación lipídica mostraban daños similares a los causados durante la criopreservación de espermatozoides: disminución de la motilidad, pérdida de fosfolípidos y modificaciones estructurales de la membrana plasmática de la región

acrosomal. Esto género que en 1984 se utilizara ditioneitol (DTT) a una concentración de 5 mM como antioxidante en el medio de congelación, para mejorar la recuperación de espermatozoides motiles luego de ser descongelados. Basándose en los resultados positivos de este experimento se generó una nueva hipótesis: que la lipoperoxidación lipídica estaba implicada en el daño generado a los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Rao & David, 1984). A partir de ese momento diferentes antioxidantes han sido utilizados para mejorar la calidad seminal post descongelación de espermatozoides humanos.

La vitamina C (ácido ascórbico) es un antioxidante natural, soluble en agua, con capacidad de disminuir la concentración de radicales libres en muestras teratozoospermicas incubadas in vitro, además de mejorar la motilidad, la vitalidad y prevenir el incremento de la fragmentación de ADN espermático y la reacción acrosomal (Fanaei et al., 2014).

El ácido ascórbico también ha sido probado en la criopreservación de espermatozoides humanos. En 1994 Askari suplementa el medio crioprotector glicerol – yema de huevo con vitamina C a una concentración de 10 mM pero no mejora la calidad seminal post descongelación de la muestras seminales (Askari et al., 1994). Sin embargo, en el 2010 Branco demuestra que la adición de ácido ascórbico a una concentración de 10 mM al medio Test-Yolk buffer reduce el índice de daño del ADN espermático en un 49% en hombres infértiles y en hombres fértiles en un 13.7% medido con el ensayo cometa (Branco et al., 2010)

Por otra parte, la adición de ascorbato de sodio a una concentración de 300 μ M disminuye los niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) aproximadamente en un 16% con respecto al control, protegiendo a los espermatozoides en términos de calidad seminal, mientras que la adición de 600 μ M de ascorbato no tiene un efecto sobre la generación de ROS (Li et al., 2010).

La vitamina E es un antioxidante presente en el semen humano y en la membrana plasmática del espermatozoide humano. El trolox un análogo soluble de la vitamina E suplementado al medio de criopreservación (200 μ M) es capaz de mejorar la motilidad espermática post descongelación; pero no mejora la vitalidad ni la fragmentación de ADN en muestras normozoospermicas (24.87% vs 24.15%) y muestras no normozoospermicas (34.17% vs 41.11%) (Taylor et al., 2009) En otro trabajo se observa que la

suplementación al medio crioprotector (citrato-glicerol-yema de huevo) con vitamina E (5 mM) mejora la motilidad post descongelación y la integridad del ADN espermático en muestras normozoospermicas y astenozoospermicas observándose una mejora de aproximadamente un 10.47% y 11.11% en la motilidad y una disminución de la fragmentación del ADN espermático en un 6.97% y 9.5% respectivamente, con respecto al control, medido con SCD (Kalthur et al., 2011). Por otro lado, Minaei criopreservó muestras seminales humanas normozoospermicas con trolox (40 μ M) y mejoro la motilidad progresiva post descongelación. La vitamina E es capaz de romper los enlaces covalentes que se forman cuando ROS se une a las cadenas laterales de los lípidos de la membrana plasmática (Minaei et al., 2012).

El resveratrol es una sustancia polifenólica obtenida del vino que ha sido beneficiosa en algunas enfermedades relacionadas a la edad como la neurodegeneración, la carcinogénesis y la aterosclerosis. Resveratrol también ha probado ser útil en prevenir la lipoperoxidación lipídica durante la criopreservación de espermatozoides humanos, aunque no mejora la motilidad espermática post descongelación. En varones infértiles aumenta la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Garcez et al., 2010)

Quercetina es un flavonoide con capacidad para eliminar especies reactivas de oxígeno y es capaz de mejorar significativamente la motilidad en un 9%, la vitalidad en un 9.1% y la fragmentación de ADN en un 5.9% en muestras descongeladas cuando el medio de criopreservación es suplementado a una concentración de 10 μ M. Por otro lado, Tempol es una molécula que puede mimetizar a la enzima SOD y puede aumentar la motilidad y vitalidad espermática en un 10.1% y 10.3%, además puede disminuir la fragmentación de ADN en un 3.5% en muestras criopreservadas (Azadi et al., 2017).

L-carnitina es una molécula antioxidante que al ser suplementada en el medio de criopreservación (3 mM) tiene la capacidad de mejorar la motilidad progresiva (45% vs 40%) y disminuir significativamente el número de espermatozoides reaccionados. Además, Pentoxifilina, otra molécula antioxidante, también mejora la motilidad progresiva (60% vs 40%) en espermatozoides criopreservados cuando es suplementado a una concentración de 3 mM al medio de criopreservación (Aliabadi et al., 2018).

El Hidroxitolueno butilado (BHT) es un compuesto que tiene propiedades lipofílicas y puede convertir el peróxido de hidrógeno a hidroperóxidos y así limitar su acción oxidante. BHT puede mejorar la motilidad (34.7% vs 44.4%), viabilidad (46.56% vs

56.04%), disminuir la concentración de malondialdehído, peróxido de hidrógeno, el ion superóxido y la fragmentación de ADN (49% vs 25.3%) en muestras congeladas, cuando los espermatozoides son expuestos a una concentración de 0.5 mM por 5 minutos (Ghorbani et al., 2015). También se ha observado que BHT suplementado al medio de criopreservación, a una concentración de 1 mM, mejora la fragmentación de ADN en un 2.14 % (Merino et al., 2015).

Como se puede observar en lo descrito anteriormente el efecto antioxidante, en la criopreservación de espermatozoides humanos, va depender del tipo y concentración del antioxidante utilizado y hasta la fecha no se ha reportado cual es el mejor para proteger todos los parámetros seminales, sin embargo, Bahmyari y colaboradores en el 2019 realizaron un metaanálisis para evaluar el efecto que tienen los antioxidantes en la criopreservación de espermatozoides humanos y encontró que el uso de estos aditivos, en el medio de criopreservación, son capaces de mejorar la motilidad progresiva, la vitalidad y la fragmentación de los espermatozoides congelados. Además, reportó cuales presentaban un mejor efecto en cada parámetro seminal: 10 μ M de Quercetina (Motilidad total), 0.176 mM de L-carnitina, (Motilidad progresiva), 0.5 μ M de Tempol (Vitalidad) y 0.5 mM Butil hidroxitulueno (Fragmentación de ADN) (Bahmyari et al., 2020).

Los polifenoles pueden ejercer diversos efectos sobre los espermatozoides cuando son aplicados in vitro a diferentes dosis (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) y tiempos (1 hora y 24 horas). Baicaleína, epigallocatequina galato (EGCG), catequina galato (CG), galocatequina galato (GCG), 2,2,4,4-tetrahidroxi difenil (THP), Epicatequina galato (ECG), ácido elágico, gosipol y quercetina inhiben el potencial de membrana mitocondrial cuando los espermatozoides son expuestos a una concentración de 200 μ M por 1 hora. Por el contrario, no muestran evidencia de inhibición del potencial mitocondrial resveratrol, mioinositol y genisteína a cualquier dosis y tiempo. A altas concentraciones (200 μ M/1h) EGCG, ECG, EGCG y GCG suprimen la producción de ROS mitocondrial, mientras que gosipol, genisteína, mioinositol y pirogalol estimulan su producción. Resveratrol, quercetina, THP, GCG, EGCG, ECG no producen ROS mitocondrial en ninguna circunstancia. Baicaleína, genisteína, mioinositol, pirogalol y resveratrol inhiben el movimiento espermático a dosis altas (200 μ M/1h). Mioinositol, catequina hidrato, gosipol, GCG, CG, ácido cafeico, pirogalol, didox, EGCG, resveratrol, ECG, THP, baicaleína, y ácido elágico no son citotóxicos y los espermatozoides mantienen la viabilidad cuando son expuestos a estos compuestos por 24 horas.

Por otra parte, los polifenoles extraídos de algas se presentan como una alternativa viable para ser usados en los tratamientos de infertilidad y criopreservación de espermatozoides humanos debido a que muestran capacidad para proteger diferentes líneas celulares, como neuronas (bieckol) y fibroblastos (eckol) contra el efecto de ROS (K. A. Kang, Lee, Chae, Zhang, Jung, Lee, et al., 2005; S. M. Kang et al., 2012). Los polifenoles pueden eliminar radicales libres donando sus electrones y formando un radical fenólico, que se estabiliza por resonancia al deslocalizar su electrón desapareado dentro de su anillo aromático, también se pueden estabilizar formando puentes de hidrogeno con otro grupo OH cercano o formando dímeros con otro radical fenilo para formar enlaces C-C o C-O (K. A. Kang, Lee, Chae, Zhang, Jung, Lee, et al., 2005; Shibata et al., 2015). Entre estas moléculas polifenólicas promisorias se encuentra floroglucinol.

Floroglucinol (1, 3, 5 trihidroxibenceno) y sus polímeros son compuestos polifenólicos que se conocen con el nombre de florotaninos; estos compuestos son encontrados en las algas pardas que pertenecen a la clase Phaeophyceae (Catarino et al., 2019; Generalić Mekinić et al., 2019). Los florotaninos aislados de las algas pardas de familia Laminareacea se encuentran en las células vegetativas de la capa cortical y están compuestos aproximadamente por floroglucinol (0.9%), un tetrámero de floroglucinol (4,4%), eckol (7.5%), florofucofuroeckol A (21.9%), dieckol (23.4%), y 8,8- bieckol (24,6%), además de otros compuestos desconocidos (17,3%) (Shibata et al., 2004). Estos polímeros fueron identificados como inhibidores de la glicación y la alfa amilasa implicados en la causa de complicaciones diabéticas y como antioxidantes con capacidad de captura de radicales libres (Okada et al., 2004; Shibata et al., 2008).

Entre las actividades biológicas que han sido descritas para floroglucinol destacan su capacidad para proteger a células somáticas del daño oxidativo, generado por su exposición a la radiación ionizante gamma, tanto in vitro como in vivo. También presentan la capacidad de neutralizar radicales libres como el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), el radical hidroxilo, el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. Además, estimula la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, contribuyendo de manera indirecta en la captura de radicales libres (K. A. Kang et al., 2006, 2010; K. A. Kang, Lee, Chae, Zhang, Jung, Ham, et al., 2005). A una concentración de 50 µg/mL floroglucinol es capaz de reducir significativamente el estrés oxidativo producido por dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) y la lipoperoxidación lipídica en la línea celular LLC-PK1. Además,

puede reducir el estrés oxidativo causado por H₂O₂ en la línea celular WI-38 (So & Cho, 2014). También se ha observado que floroglucinol no afecta la viabilidad de las líneas celulares HepG2 (línea celular de cáncer hígado) y IEC-6 (línea celular de epitelio intestinal) cuando son sometidas a una concentración de 50 µg/ml aproximadamente (M. H. Kang et al., 2014; Quéguineur et al., 2012).

Floroglucinol es capaz de reducir la concentración de especies reactivas de oxígeno intracelulares y la fragmentación de ADN a concentraciones de 10 µg/ml en las células SH-SY5Y, así como también la concentración de carbonilación proteica y concentración de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina. En las células V79-4 ejerce un efecto citoprotector contra la radiación ionizante gamma y reduce la fragmentación de ADN producida por estrés oxidativo. (K. A. Kang et al., 2010; H. S. Kim et al., 2012).

También han sido descritas sus propiedades para inhibir la inflamación crónica vía inhibición de las vías metabólicas NIK y ERK; además de brindar protección a las células neuronales que presentan escaso citoplasma y presentan una menor cantidad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (H. S. Kim et al., 2012; M. M. Kim & Kim, 2010). Sus propiedades antiinflamatorias también han sido asociadas a su capacidad para inhibir las ciclooxigenasas (COX) y ROS (Chang et al., 2012). Por otra parte se ha demostrado que la inhibición de ciclooxigenasas puede generar un descenso en la motilidad espermática (Kennedy et al., 2003; Liu et al., 2020).

En el ámbito reproductivo floroglucinol solo ha sido probado para tratar la disfunción sexual en ratas. Cuando se administró floroglucinol (250 mg/Kg de peso) por seis semanas en ratas inducidas a diabetes, con disfunción sexual, se observa que el grupo tratado aumenta su concentración de testosterona, su conteo espermático y mejora su comportamiento sexual (Kashif et al., 2019).

El uso de floroglucinol como aditivo crioprotector solo ha sido probado en la vitrificación de protocormos y semillas de orquídeas, mejorando los porcentajes de recuperación, supervivencia, viabilidad, germinación, crecimiento y formación de hojas post descongelación. Así mismo su eficacia se debería a su capacidad antioxidante y a un efecto sinérgico cuando se combina con glicerol (Galdiano et al., 2012; Vendrame & Faria, 2011).

Debido a estas evidencias el floroglucinol podría mejorar la calidad seminal post descongelación de muestras espermáticas criopreservada.

IV. HIPÓTESIS

La suplementación de floroglucinol al medio de congelación mejorará la motilidad, vitalidad y fragmentación de ADN de los espermatozoides descongelados.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú, en conjunto con el laboratorio de andrología de la Clínica Inmater.

5.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es tipo experimental y prospectiva.

5.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño del experimento consistió en dividir una muestra seminal en cuatro alícuotas de 0.5 mL. Cada alícuota fue criopreservada con medio de congelación suplementado con floroglucinol (1, 2, 3 trihidroxibenceno) a diferentes concentraciones. Al final se tuvo un control (0 $\mu\text{g/mL}$) y tres tratamientos (5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente las muestras fueron almacenadas durante 7 días en un balón de nitrógeno líquido y luego se descongelaron para analizar los siguientes parámetros de calidad seminal: motilidad, vitalidad y fragmentación de ADN. Los resultados de cada uno de los tratamientos se compararon con el control.

5.4 VARIABLES

5.4.1 VARIABLE INDEPENDIENTE

- Concentración de floroglucinol (1, 2, 3 trihidroxibenceno): 0 µg/mL, 5 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL.

5.4.2 VARIABLES DEPENDIENTES

- Motilidad espermática.
- Vitalidad espermática.
- Fragmentación de ADN.

5.5 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable	Definición	Tipo de variable		Indicador
Concentración de Floroglucinol	Cantidad de soluto presente en un volumen determinado de solvente.	Independiente	Cualitativa ordinal	0 µg/mL; 5 µg/mL; 25 µg/mL y 50 µg/mL
Promedio de la Motilidad espermática	Media aritmética del porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento progresivo.	Dependiente	Cuantitativa continua	Porcentaje de espermatozoides motiles.
Promedio de la vitalidad espermática	Media aritmética del porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta.	Dependiente	Cuantitativa continua	Porcentaje de espermatozoides vivos.
Promedio de la fragmentación de ADN	Media aritmética del porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN.	Dependiente	Cuantitativa continua	Índice de fragmentación de ADN espermático

5.6 OBTENCIÓN DE MUESTRA

Se utilizó la muestra seminal de un total de 22 pacientes de 21 a 48 años de la clínica Inmater, en la ciudad de Lima-Perú, que fueron previamente informados del estudio y firmaron un consentimiento informado para donar su muestra de forma voluntaria. La clínica Inmater autorizó el retiro de las muestras para la investigación (Anexo 1).

Las muestras seminales se colectaron por masturbación, en frascos estériles de boca ancha, después de 3 a 5 días de abstinencia sexual. Posteriormente se depositó la muestra en la estufa durante 20 a 30 minutos hasta su licuefacción y acto seguido se analizó los parámetros de calidad seminal establecidos en el manual para el examen del semen humano y su interacción con el moco cervical de la organización mundial de la salud (World Health Organization, 2010). Las muestras que fueron congeladas cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: concentración espermática $\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides/ml, espermatozoides por eyaculado $\geq 39 \times 10^6$ espermatozoides, motilidad progresiva $\geq 32\%$, motilidad total $\geq 40\%$, vitalidad $\geq 58\%$, morfología $\geq 4\%$ y concentración de células redondas $< 5 \times 10^6$ spz/mL.

5.7 CRIOPRESERVACIÓN

Se prepararon 4 alícuotas de una muestra de semen fresco y fueron mezcladas en una proporción 1:1 con medio de criopreservación (glicerol 15%, NaCl 5.8 g/L, KCl 0.4 g/L, lactato de Ca 0.76 g/L, NaHCO₃ 2.6 g/L, NaH₂PO₄ 0.05 g/L, fructosa 8.59 g/L, glicina 10 g/L, estreptomycin 0.05 g/L, penicilina 0.05 g/L y albumina sérica humana al 5%) previamente atemperado y suplementado (10 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL) o no (0 µg/mL) con floroglucinol (Taylor et al., 2009). El medio crioprotector fue añadido gota a gota durante 30 minutos, dejando equilibrar las alícuotas de semen durante 10 minutos antes de proceder a la congelación. Las concentraciones finales de floroglucinol en las muestras a congelar fueron: 0 µg/mL, 5 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL. En el Anexo 2 se puede visualizar la ficha técnica de floroglucinol.

Las alícuotas de semen-crioprotector fueron cargadas en pajillas de criopreservación de 0.5 ml, previamente rotulados con el código de muestra y la concentración de floroglucinol utilizado. Posteriormente las pajillas fueron selladas con alcohol polivinílico y colocadas sobre un bloque de hielo seco para su congelación a -78.5°C

durante 1 hora. Cuando las pajillas estuvieron completamente congeladas fueron colocadas en un portapajillas y almacenadas en un balón de nitrógeno líquido a -196°C hasta su descongelación (Gil-Salom et al., 2000).

5.8 DESCONGELACIÓN

Las pajillas fueron retiradas del balón de nitrógeno líquido, siete días después de su almacenamiento, y fueron sumergidas en un recipiente con agua, durante 5 minutos, para posteriormente ser colocadas, en una incubadora a 37°C , durante 10 minutos. El contenido de cada pajilla fue vaciado en tubos de fondo cónico de 15 ml que contenían 2 ml de fluido tubárico humano sintético, se centrifugó a 1500 R.P.M y el pellet fue resuspendido en 0.5 ml, luego se analizó los parámetros de calidad seminal (Gil-Salom et al., 2000).

5.9 ANÁLISIS DE LA CALIDAD SEMINAL

5.9.1 MOTILIDAD

Para evaluar la motilidad se colocó 10 μL de semen (fresco o congelado) sobre un portaobjetos previamente atemperado a 37°C y fue cubierto con un cubreobjetos. La lamina se observó a 400 aumentos bajo microscopio de campo claro y se clasificó los espermatozoides de acuerdo con su movimiento en progresivos, no progresivos e inmóviles. Se prepararon dos láminas y se contaron 200 espermatozoides respectivamente (**Figura 1**). El factor de criosupervivencia (FC) de la motilidad progresiva y de la motilidad total fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{FC} = \frac{\text{Porcentaje de espermatozoides móviles en la muestra fresca}}{\text{Porcentaje de espermatozoides móviles post descongelación}}$$

5.9.2 VITALIDAD

La vitalidad se evaluó mezclando 20 μL de semen (fresco o congelado) con una solución de eosina en una proporción 1: 1 (semen: tinción). Después de 30 segundos 10 μL de la mezcla se colocó sobre un portaobjetos y fue cubierta con un cubreobjetos. Cada lámina se evaluó a 400 aumentos y los espermatozoides se clasificaron en vivos y muertos (color

rojo) en base a la coloración de la cabeza del espermatozoide. Se prepararon dos láminas y se contaron 200 espermatozoides por lámina (**Figura 2**).

5.9.3 MORFOLOGÍA

Se dispense 200 µL de la muestra (fresco o descongelado) en un tubo cónico y se mezcló con 5 mL de solución salina. Se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm y el pellet se resuspendió en 200 µL de solución salina. Se preparó un frotis con 10 µL de la muestra resuspendida por duplicado. Cada lámina fue teñida con el método de tinción Diff-Quick el cual consistió en someter las láminas a una solución de fijación durante 15 segundos, a una solución de xantina acidófila durante 10 segundos y a una solución de tiazina ácida durante 5 segundos. El portaobjetos fue lavado durante 15 segundos en agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Se evaluó 100 espermatozoides por lámina a 1000 aumentos (**Figura 3**).

5.9.4 CONCENTRACIÓN

La concentración espermática se obtuvo utilizando una cámara de Neubauer mejorada. En resumen, se diluyó la muestra con solución Weigman en proporción a la cantidad de espermatozoides observados durante la evaluación de la motilidad. Posteriormente se cargó por capilaridad la cámara de Neubauer y se procedió al conteo de espermatozoides a 400 aumentos. La fórmula que se utilizó para determinar la concentración de espermatozoides fue:

$$\text{Millones de espermatozoides/mL} = \frac{\text{Número de espermatozoides} * \text{Factor de dilución}}{\text{Número de filas} * 20\text{nL}}$$

5.9.5 NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES POR EYACULADO

El número de espermatozoides por eyaculado se obtuvo multiplicando el volumen seminal (mL) por la concentración espermática (espermatozoides/eyaculado).

5.9.6 INTEGRIDAD DEL ADN

Para la evaluar la integridad de ADN espermático se usó el kit Halosperm (Halotech DNA) y se siguió los pasos recomendados por el fabricante. Primero, se calentó un tubo de agarosa de bajo punto de fusión a 100°C durante 5 minutos y posteriormente el tubo fue atemperado a 37°C. Se añadió 25 µl de muestra seminal, previamente diluida a 5 millones por mililitro, a la agarosa de bajo punto de fusión. 20 µl de la mezcla fue depositada sobre un portaobjetos pretratado con agarosa y cubierta con un cubreobjetos. EL portaobjetos se mantuvo durante 5 minutos en el frigorífico para que la agarosa gelifique. La solución desnaturalizante se preparó mezclando 80 µl de solución ácida desnaturalizante del kit con 10 mL de agua destilada. Los portaobjetos fueron retirados del frigorífico y se retiraron los cubreobjetos con sumo cuidado. A continuación, se incubó las láminas con solución desnaturalizante durante 7 minutos, posteriormente se retiraron de la solución desnaturalizante y fueron incubados en solución de lisis durante 25 minutos. Los portaobjetos posteriormente se mantuvieron en agua destilada durante 5 minutos y se deshidrataron con alcohol de 70, 90 y 100 grados durante 2 minutos respectivamente. Luego se dejó secar la muestra a temperatura ambiente y se realizó la tinción con Wright durante 10 minutos. La clasificación del grado fragmentación se realizó de acuerdo con la dispersión de la cromatina; espermatozoides con ADN no fragmentado (halo grande y halo medio) y fragmentado (halo pequeño, sin halo y degradado). Se realizó un conteo de 500 espermatozoides por lamina y se calculó el índice de fragmentación de ADN (**Figura 4**).

5.9.7 ANÁLISIS ESTADISTICO

Los efectos de la suplementación de floroglucinol sobre la motilidad, vitalidad y fragmentación de ADN post descongelación se analizó utilizando el análisis de varianza unifactorial univariado con medias repetidas (ANOVA). Las variables que no cumplieran con el supuesto de normalidad fueron normalizadas elevando al cuadrado los valores de la variable. Cuando las diferencias fueron significativas se realizó la comparación por pares utilizando T de student con ajuste de Bonferroni. El nivel de significancia para rechazar la hipótesis nula fue de 0.05 (Guisande et al., 2011).

VI. ASPECTO ÉTICO

Las consideraciones de este proyecto fueron evaluadas por la clínica Inmater, brindando su aprobación para el retiro de las muestras con el previo consentimiento de los pacientes (Anexo 2).

VII. RESULTADOS

Veintidós pacientes fueron incluidos en este estudio, con una edad media de 35 ± 1.60 años. Todas las muestras donadas presentaron características seminales normales antes de la criopreservación (**Tabla 1**).

7.1 PARÁMETROS SEMINALES POST DESCONGELACIÓN

Los resultados obtenidos de motilidad, factor de criosupervivencia, vitalidad y fragmentación de ADN espermático post descongelación se encuentran resumidos en la **Tabla 2**.

7.1.1 MOTILIDAD ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN

Hubo un efecto significativo de las diferentes concentraciones de floroglucinol sobre la motilidad progresiva de las muestras descongeladas ($F_{13,63}=5.46$, $P=0.002$), mostrándose en la comparación por pares que las muestras congeladas con $5 \mu\text{g/mL}$ de floroglucinol mejora significativamente la motilidad progresiva post descongelación con respecto al control ($15.60 \pm 2.00\%$ vs $19.20 \pm 2.26\%$, $P=0.032$). Por otra parte, se observa que la motilidad progresiva post descongelación disminuye con el aumento de las concentraciones de floroglucinol ($25 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$), aunque no muestran diferencias significativas con respecto al control ($15.60 \pm 2.00\%$ vs 16.50 ± 1.70 , $P=0.32$ y $15.60 \pm 2.00\%$ vs 14.00 ± 1.70 , $P=0.32$, respectivamente). Sin embargo, las muestras congeladas con $50 \mu\text{g/mL}$ de floroglucinol disminuyen significativamente con respecto a las muestras congeladas con $5 \mu\text{g/mL}$ de floroglucinol ($P=0.002$, **Figura 5**).

La motilidad total de las muestras descongeladas presenta la misma tendencia que la motilidad progresiva, con un aumento de espermatozoides motiles en las muestras congeladas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de floroglucinol ($23.00 \pm 2.48\%$) con respecto al control ($19.20 \pm 2.15\%$) y disminuye a concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$ ($20.00 \pm 2.00\%$) y 50 $\mu\text{g/mL}$ ($17.80 \pm 2.05\%$), presentando diferencia significativa ($F_{[3,63]} = 3.29$, $P = 0.026$), sin embargo, en la comparación por pares no se evidencia diferencia estadística entre las muestras congeladas con floroglucinol y el control; pero sí con las muestras congeladas con 50 $\mu\text{g/mL}$ que disminuyen con respecto a las muestras congeladas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de floroglucinol ($P=0.032$, **Figura 6**).

7.1.2 FACTOR DE CRIOSUPERVIVENCIA

El factor de criosupervivencia de la motilidad progresiva confirma que existe un efecto significativo de floroglucinol sobre la motilidad progresiva de las muestras post descongelación ($F_{[3,63]}=5.04$, $P=0.003$). En la comparación por pares se observa que existe diferencias estadísticas significativa entre el control y las muestras congeladas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de floroglucinol ($25.80 \pm 3.02\%$ vs 31.70 ± 2.73 , $P=0.044$), así como entre las muestras congeladas con 5 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ de floroglucinol ($31.70 \pm 2.73\%$ vs 23.80 ± 2.46 , $P=0.003$, **Figura 7**).

Al igual a lo mencionado anteriormente para la motilidad total, el factor de criosupervivencia de la motilidad total también presenta diferencia significativa entre las muestras congeladas con diferentes concentraciones de floroglucinol ($F_{[3,63]}=2.92$, $P=0.041$) y en la comparación por pares se percibe una disminución significativa de las muestras congeladas con 50 $\mu\text{g/mL}$ de floroglucinol con respecto a las muestras congeladas con 5 $\mu\text{g/mL}$ floroglucinol ($27.3 \pm 2.48\%$ vs $34.6 \pm 2.50\%$, $P=0.0034$, **Figura 8**).

7.1.3 VITALIDAD ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN

Aunque la vitalidad de las muestras criopreservadas con floroglucinol fueron ligeramente superiores no se observó diferencias significativas ($F_{[3,63]}=1.22$, $P=0.31$, **Figura 9**) entre el control ($35.40 \pm 2.06\%$) y los tratamientos: 5 $\mu\text{g/mL}$ ($38.60 \pm 2.78\%$), 25 $\mu\text{g/mL}$ ($38.60 \pm 2.78\%$), 50 $\mu\text{g/mL}$ ($37.40 \pm 2.79\%$).

7.1.4 INTEGRIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO POST DESCONGELACIÓN

Floroglucinol tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la fragmentación de ADN espermático post descongelación ($F_{[3,63]}=9.82$, $P\leq 0.0001$, **Figura 10**). Se puede observar, que el porcentaje de espermatozoides fragmentados disminuye significativamente en las muestras congeladas con 5 $\mu\text{g/mL}$ ($27.3 \pm 2.11\%$, $P=0.01$), 25 $\mu\text{g/mL}$ ($25.7 \pm 1.94\%$, $P<0.001$) y 50 $\mu\text{g/mL}$ ($24.7 \pm 1.86\%$, $P<0.01$) de floroglucinol con respecto al control ($29.8 \pm 1.89\%$). La fragmentación de ADN disminuye conforme aumenta las concentraciones de floroglucinol, pero en la comparación por pares no se observa diferencias significativas entre los tratamientos (10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$)

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antioxidante de floroglucinol sobre la calidad espermática post descongelación de espermatozoides humanos en individuos normozoospermicos. La criopreservación de espermatozoides humanos es una técnica comúnmente utilizada en los tratamientos de reproducción asistida, sin embargo, durante este proceso, la congelación puede reducir la motilidad y viabilidad espermática por debajo del 50% (Hallak et al., 2000; Nallella et al., 2004; Nijs & Ombelet, 2001), además aumenta el porcentaje de espermatozoides fragmentados post descongelación (Raad et al., 2018). En esta investigación el porcentaje de motilidad, vitalidad y fragmentación de ADN espermático, es coherente a los resultados obtenidos en investigaciones previas (Lusignan et al., 2018; Taylor et al., 2009).

El proceso de congelación-descongelación tuvo un efecto negativo sobre las muestras seminales criopreservadas, sin embargo, la motilidad mejoro significativamente cuando los espermatozoides fueron criopreservados con floroglucinol a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado puede ser explicado por la capacidad que tiene floroglucinol para reducir el estrés oxidativo generado por ROS. Floroglucinol es una molécula polifenólica con actividad antioxidante que puede reducir el estrés oxidativo inducido por radiación o H_2O_2 , eliminar radicales libres y aumentar la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, en células somáticas (K. A. Kang et al., 2006; K. A. Kang, Lee, Chae, Zhang, Jung, Ham, et al., 2005).

Sin embargo, la motilidad no se mantiene y disminuye a medida que la concentración de floroglucinol aumenta. El efecto de floroglucinol sobre la motilidad, a concentraciones iguales o superiores a 25 µg/mL (200 µM aprox.), podría deberse a su capacidad para inhibir las ciclooxigenasas 1 y 2, involucradas en la producción de prostaglandinas E (Chang et al., 2012; M. M. Kim & Kim, 2010), estas han sido descritas como inductores de la motilidad y otras funciones en el sistema reproductivo humano. En el semen de pavos la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 genera un descenso en la motilidad espermática, mientras que en varones fértiles la motilidad espermática disminuye cuando la concentración de COX1 es menor a 17.5 ng/mL (Kennedy et al., 2003; Liu et al., 2020).

Otra posible explicación es que floroglucinol inhiba el potencial de membrana mitocondrial y suprima la producción de ROS mitocondrial en los espermatozoides, como se ha observado con otros polifenoles como catequina galato, epicatequina galato, epigallocatequina galato, galocatequina galato y 2,2,4,4 tetrahidroxi difenil (THP). Estos no estimulan la producción de ROS intracelular, así como tampoco de 4-hidroxinonal, 8-oxo-2'-desoxiguanosina y no afectan la viabilidad espermática, cuando los espermatozoides son expuestos a una concentración de 200 µM por 1 hora (R.J. Aitken et al., 2016). Se conoce que la mitocondria es la principal fuente de ROS en los espermatozoides (Robert J. Aitken, 2017). En esta investigación los espermatozoides fueron expuestos a floroglucinol por 2 horas aproximadamente, durante su congelación y descongelación, mientras que la exposición fue inerte cuando fueron almacenados a -196°C. Por otro lado, resveratrol es un antioxidante polifenólico al igual que floroglucinol e inhibe la motilidad espermática post descongelación en hombres fértiles e infértiles, pero previene el estrés oxidativo (Garcez et al., 2010).

La viabilidad de las muestras congeladas con floroglucinol no mejora significativamente, pero floroglucinol no produce un efecto citotóxico sobre las células espermáticas durante la criopreservación. Este resultado está acorde con trabajos previos donde se observa que en las líneas celulares HepG2 (línea celular de cáncer hígado) y IEC-6 (línea celular de epitelio intestinal) floroglucinol no produce un efecto citotóxico a concentraciones entre 10 - 50 µg/mL aproximadamente (M. H. Kang et al., 2014; Quéguineur et al., 2012). Además, floroglucinol a una concentración de 50 µg/mL presenta capacidad para eliminar ROS, disminuyendo el estrés oxidativo y peroxidación lipídica generado por moléculas oxidantes como hidroperóxidos en las líneas celulares LLC-PK1 (epitelio de riñón) y WI-8 (fibroblastos) (So & Cho, 2014).

La fragmentación de ADN es un buen indicador de estrés oxidativo en las células espermáticas, puesto que el ADN es susceptible al ataque directo por ROS o por los productos secundarios de la lipoperoxidación lipídica (malondialdehído, acrolina, 4-hidroxinonenal), que producen mutaciones y sitios abásicos, que generan desestabilidad y cortes en la cadena de ADN (Robert J. Aitken, 2017; Wright et al., 2014). Los resultados obtenidos en este estudio evidencian, que la suplementación de floroglucinol, en el medio de congelación, puede reducir el estrés oxidativo generado en la criopreservación espermática, disminuyendo el porcentaje de espermatozoides fragmentados. Floroglucinol al ser una molécula polifenólica tiene la capacidad de donar electrones y eliminar la actividad de ROS. Cuando floroglucinol pierde un electrón es capaz de estabilizarse mediante resonancia o formando enlaces con otra molécula de floroglucinol.

También se ha observado que floroglucinol es capaz de reducir la concentración de especies reactivas de oxígeno intracelulares y la fragmentación de ADN a concentraciones de 10 µg/mL en las células SH-SY5Y (células de neuroblastoma) y las células V79-4 (fibroblastos de hámster), respectivamente (K. A. Kang et al., 2010; H. S. Kim et al., 2012).

Como se observa en los resultados floroglucinol a una concentración de 50 µg/mL disminuye la fragmentación de ADN en un 5.1 % aproximadamente. En trabajos previos donde se utiliza una molécula antioxidante en el medio de congelación, se observa una reducción de la fragmentación entre 2.14% a 14.5 % (Branco et al., 2010; Ghorbani et al., 2015; Kalthur et al., 2011; Li et al., 2010; Merino et al., 2015), sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos de estos resultados publicados no se pueden comparar debido a la variabilidad en el medio de criopreservación, la técnica de congelación utilizada y la técnica para evaluar la fragmentación de ADN.

En este trabajo se observa que floroglucinol disminuye significativamente la fragmentación de ADN y puede ser una buena alternativa para reducir el daño producido sobre el genoma paterno que se genera en la criopreservación de espermatozoides humanos, sin embargo, a 50 µg/mL la motilidad disminuye, por lo cual, solo sería aplicable para realizar una fecundación in vitro mediante inyección intracitoplasmática (ICSI), donde el porcentaje de motilidad no es relevante.

IX. CONCLUSIONES

- La suplementación de floroglucinol al medio de criopreservación mejora la motilidad espermática post descongelación a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$.
- Concentraciones iguales o mayores a 50 $\mu\text{g/mL}$ de floroglucinol disminuyen la motilidad espermática post descongelación.
- Floroglucinol no ejerce un efecto citotóxico a concentraciones de 5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ durante la congelación y descongelación de espermatozoides humanos.
- Floroglucinol protege el ADN espermático del estrés oxidativo generado durante la criopreservación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *13*(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Agca, Y., & Critser, J. K. (2002). Cryopreservation of Spermatozoa in Assisted Reproduction. *Seminars in Reproductive Medicine*, *20*(1), 015–024. <https://doi.org/10.1055/s-2002-23516>
- Aitken, R., Baker, M., & Nixon, B. (2015). Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian Journal of Andrology*, *17*(4), 633. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153850>
- Aitken, R. John, Baker, M. A., De Iuliis, G. N., & Nixon, B. (2010). New insights into sperm physiology and pathology. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *198*, 99–115. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02062-9_7
- Aitken, R.J., Muscio, L., Whiting, S., Connaughton, H. S., Fraser, B. A., Nixon, B., Smith, N. D., & De Iuliis, G. N. (2016). Analysis of the effects of polyphenols on human spermatozoa reveals unexpected impacts on mitochondrial membrane potential, oxidative stress and DNA integrity; implications for assisted reproductive technology. *Biochemical Pharmacology*, *121*, 78–96. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.015>
- Aitken, Robert J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, *84*(10), 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>
- Aliabadi, E., Jahanshahi, S., Talaei-Khozani, T., & Banaei, M. (2018). Comparison and evaluation of capacitation and acrosomal reaction in freeze-thawed human ejaculated spermatozoa treated with L-carnitine and pentoxifylline. *Andrologia*, *50*(2), e12845. <https://doi.org/10.1111/and.12845>
- Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, *13*(3), 232–241. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.1992.tb00306.x?sid=nlm%3Apubmed>
- Askari, H. A., Check, J. H., Peymer, N., & Bollendorf, A. (1994). Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *33*(1), 11–15. <https://doi.org/10.3109/01485019408987797>
- Atig, F., Raffa, M., Habib, B. A., Kerkeni, A., Saad, A., & Ajina, M. (2012). Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urology*, *12*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-12-6>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*, 1–31.

<https://doi.org/10.1155/2014/360438>

- Azadi, L., Tavalae, M., Deemeh, M. R., Arbabian, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2017). Effects of tempol and quercetin on human sperm function after cryopreservation. *Cryo-Letters*, *38*(1), 29–36.
- Bahmyari, R., Zare, M., Sharma, R., Agarwal, A., & Halvaei, I. (2020). The efficacy of antioxidants in sperm parameters and production of reactive oxygen species levels during the freeze- thaw process: A systematic review and meta- analysis. *Andrologia*, *52*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1111/and.13514>
- Bjorndahl, L., Mortimer, D., Barratt, C. L. R., Castilla, J. A., Menkveld, R., Kvist, U., Alvarez, J. G., & Haugen, T. B. (2010). A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology. In *Journal of Petrology* (Vol. 369, Issue 1). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511729942>
- Borges, E., Zanetti, B. F., Setti, A. S., Braga, D. P. de A. F., Provenza, R. R., & Iaconelli, A. (2019). Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. *Fertility and Sterility*, *112*(3), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.029>
- Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B., & Salvador, M. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, *60*(2), 235–237. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.012>
- Catarino, M., Silva, A., Mateus, N., & Cardoso, S. (2019). Optimization of Phlorotannins Extraction from *Fucus vesiculosus* and Evaluation of Their Potential to Prevent Metabolic Disorders. *Marine Drugs*, *17*(3), 162. <https://doi.org/10.3390/md17030162>
- Chang, M. C., Chang, H. H., Chan, C. P., Chou, H. Y., Chang, B. E., Yeung, S. Y., Wang, T. M., & Jeng, J. H. (2012). Antiplatelet effect of phloroglucinol is related to inhibition of cyclooxygenase, reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A₂ production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *263*(3), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.06.021>
- Chatterjee, S., & Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, *59*(4), 451–458. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>
- Colagar, A. H., Karimi, F., & Jorsaraei, S. G. A. (2013). Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno- teratospermic men. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, *15*(9), 780–785. <https://doi.org/10.5812/ircmj.6409>
- Collet, J. F., & Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants and Redox Signaling*, *13*(8), 1205–1216. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3114>
- Das, P., Choudhari, A. R., Dhawan, A., & Singh, R. (2009). Role of ascorbic acid in human seminal plasma against the oxidative damage to the sperms. *Indian Journal*

of *Clinical Biochemistry*, 24(3), 312–315. <https://doi.org/10.1007/s12291-009-0058-2>

- Del Río, M. J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M. E., Moreno, R. D., & Vigil, P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: Avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*, 5(4), 368–373. [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(07\)74086-4](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(07)74086-4)
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/854837>
- Dominguez, K., Arca, C. D. R., & Ward, W. S. (2011). The Relationship Between Chromatin Structure and DNA Damage in Mammalian Spermatozoa. In *Sperm Chromatin* (Vol. 45, Issue 3, pp. 61–68). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_4
- Drevet, J. R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1–2), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.027>
- Durairajanayagam, D. (2019). Physiological Role of Reactive Oxygen Species in Male Reproduction. In *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction* (pp. 65–78). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812501-4.00008-0>
- Dutta, S., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab Journal of Urology*, 17(2), 87–97. <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1599624>
- Erdem Öztürk, A., Numan Bucak, M., Bodu, M., Başpınar, N., Çelik, İ., Shu, Z., Keskin, N., & Gao, D. (2019). Cryobiology and Cryopreservation of Sperm. In *Cryopreservation [Working Title]* (Vol. 395, Issue tourism, pp. 116–124). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89789>
- Fanaei, H., Khayat, S., Halvaei, I., Ramezani, V., Azizi, Y., Kasaeian, A., Mardaneh, J., Parvizi, M. R., & Akrami, M. (2014). Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 12(2), 103–110.
- Fawcett, D. W. (1970). A Comparative View of Sperm Ultrastructure. *Biology of Reproduction*, 2(suppl_2), 90–127. https://doi.org/10.1095/biolreprod2.Supplement_2.90
- Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- Freitas, J. M., Vijayaraghavan, S., & Fardilha, M. (2016). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction*, 96(December 2016), 2–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144337>
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M. A., Garcia-Vazquez, F. A., & Gardon, J. C. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after

- cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 62(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.12.001>
- Gaffney, E. A., Gadêlha, H., Smith, D. J., Blake, J. R., & Kirkman-Brown, J. C. (2011). Mammalian Sperm Motility: Observation and Theory. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 43(1), 501–528. <https://doi.org/10.1146/annurev-fluid-121108-145442>
- Galdiano, R. F., Lemos, E. G. M., Faria, R. T., & Vendrame, W. A. (2012). Cryopreservation of Dendrobium hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Scientia Horticulturae*, 148, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.036>
- Garcez, M. E., Dos Santos Branco, C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F., & Salvador, M. (2010). Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and Sterility*, 94(6), 2118–2121. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.058>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. *Antioxidants*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Popović Perković, Z. (2019). Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification. *Biomolecules*, 9(6), 244. <https://doi.org/10.3390/biom9060244>
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 979–986. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>
- Ghorbani, M., Amiri, I., Khodadadi, I., Fattahi, A., Atabakhsh, M., & Tavilani, H. (2015). Influence of BHT inclusion on post-thaw attributes of human semen. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(1), 57–61. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.968267>
- Giannattasio, A., De Rosa, M., Smeraglia, R., Zarrilli, S., Cimmino, A., Di Rosario, B., Ruggiero, R., Colao, A., & Lombardi, G. (2002). Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *Journal of Endocrinological Investigation*, 25(11), 983–986. <https://doi.org/10.1007/BF03344072>
- Gil-Salom, M., Romero, J., Rubio, C., Ruiz, A., Remohí, J., & Pellicer, A. (2000). Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169(1–2), 15–19. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00345-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00345-2)
- González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 13(11), 14026–14052. <https://doi.org/10.3390/ijms131114026>
- Goyal, M. M., & Basak, A. (2010). Human catalase: Looking for complete identity. *Protein and Cell*, 1(10), 888–897. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0113-z>
- Guisande, C., Vaamonde, A., & Berreiro, A. (2011). *Tratamiento de datos con R, STATISTICA y SPSS*.
- Gupta, G. S. (2005). Acrosomal Enzymes. In *Proteomics of Spermatogenesis* (pp. 555–584). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-27655-6_23
- Gupta, S., Sharma, R., & Agarwal, A. (2018). The Complete Guide to Male Fertility Preservation. In A. Majzoub & A. Agarwal (Eds.), *The Complete Guide to Male Fertility Preservation* (pp. 183–204). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42396-8>
- Hallak, J., Sharma, R. K., Wellstead, C., & Agarwal, A. (2000). Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*, 45(1), 38–42.
- Hammadeh, M. E., Filippou A, A., & Hamad, M. F. (2009). Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *International Journal of Fertility and Sterility*, 3(3), 87–110.
- Henkel, R. R., & Franken, D. R. (2011). Sperm DNA Fragmentation: Origin and Impact on Human Reproduction. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*, 2(2), 88–108. <https://doi.org/10.1177/205891581100200204>
- Henry, M. A., Noiles, E. E., Gao, D., Mazur, P., & Critser, J. K. (1993). Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility*, 60(5), 911–918. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56296-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56296-7)
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Jequier, A. M. (2000). Male Infertility. In *Sbornik vedeckych praci Lekarske fakulty Karlovy univerzity v Hradci Kralove. Supplementum* (Vol. 28, Issue 1). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470696019>
- Jeulin, C., Soufir, J. C., Weber, P., Laval- Martin, D., & Calvayrac, R. (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*, 24(2), 185–196. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240206>
- Kalthur, G., Raj, S., Thiyagarajan, A., Kumar, S., Kumar, P., & Adiga, S. K. (2011). Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. *Fertility and Sterility*, 95(3), 1149–1151. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.10.005>
- Kang, K. A., Lee, kyoung H., Chae, S., Zhang, R., Jung, M. S., Lee, Y., Kim, S. young, Kim, H. S., Joo, H. G., Park, J. W., Ham, Y. M., Lee, N. H., & Hyum, J. W. (2005).

- Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Letters*, 579(28), 6295–6304. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.008>
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S., Zhang, R., Jung, M. S., Ham, Y. M., Baik, J. S., Lee, N. H., & Hyun, J. W. (2006). Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(3), 609–620. <https://doi.org/10.1002/jcb.20668>
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S., Zhang, R., Jung, M. S., Ham, Y. M., Baik, J. S., Lee, N. H., & Hyun, J. W. (2005). Induction of antioxidant enzymes in phloroglucinol treated cells. *한국환경성독물연변이·발암원학회지*, 25(4), 129–133.
- Kang, K. A., Zhang, R., Chae, S., Lee, S. J., Kim, J., Kim, J., Jeong, J., Lee, J., Shin, T., Lee, N. H., & Hyun, J. W. (2010). Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) protects against ionizing radiation-induced cell damage through inhibition of oxidative stress in vitro and in vivo. *Chemico-Biological Interactions*, 185(3), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.02.031>
- Kang, M. H., Kim, I. H., & Nam, T. Jeong. (2014). Phloroglucinol induces apoptosis via apoptotic signaling pathways in HT-29 colon cancer cells. *Oncology Reports*, 32(4), 1341–1346. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3355>
- Kang, S. M., Cha, S. H., Ko, J. Y., Kang, M. C., Kim, D., Heo, S.-J., Kim, J.-S., Heu, M. S., Kim, Y. T., Jung, W. K., & Jeon, Y. J. (2012). Neuroprotective effects of phlorotannins isolated from a brown alga, *Ecklonia cava*, against H₂O₂-induced oxidative stress in murine hippocampal HT22 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.03.006>
- Kashif, S., Razdan, R., & Illuri, R. (2019). Potential of phloroglucinol to improve erectile dysfunction associated with streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Integrative Medicine*, 17(4), 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2019.04.002>
- Kennedy, J. H., Korn, N., & Thurston, R. J. (2003). Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-74>
- Khan, A., & Gowder, S. (2014). Glutathione Peroxidase: A Potential Marker for the Most Common Diseases and Disorders. *Recent Patents on Biomarkers*, 4(1), 43–52. <https://doi.org/10.2174/2210309004666140222002755>
- Kim, H. S., Lee, K., Kang, K. A., Lee, N. H., Hyun, J. W., & Kim, H. S. (2012). Phloroglucinol exerts protective effects against oxidative stress-induced cell damage in SH-SY5Y cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 119(2), 186–192. <https://doi.org/10.1254/jphs.12056FP>
- Kim, M. M., & Kim, S. K. (2010). Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2925–2933. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.029>
- Kotdawala, A. P., Kumar, S., Salian, S. R., Thankachan, P., Govindraj, K., Kumar, P., Kalthur, G., & Adiga, S. K. (2012). Addition of zinc to human ejaculate prior to

- cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(12), 1447–1453. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9894-8>
- Lee, S., Kim, S. M., & Lee, R. T. (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: From molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(10), 1165–1207. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4322>
- Len, J. S., Koh, W. S. D., & Tan, S. X. (2019). The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports*, 39(8). <https://doi.org/10.1042/BSR20191601>
- Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., & Dondero, F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: From polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, 2(3), 246–256. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.3.246>
- Li, Z., Lin, Q., Liu, R., Xiao, W., & Liu, W. (2010). Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 31(5), 437–444. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.007849>
- Liu, Y., Zhang, F., & Dai, L. (2020). Cyclooxygenase 1 (COX1) as an indicator of sperm quality in humans. *Andrologia*, 52(4), 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.13537>
- López García, M. J., Urbano Felices, A., & Cárdenas Povedano, M. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen. In *Manual de laboratorio para el análisis del semen* (1ª edición). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oss.5>
- Luna, J. J., Garrido, N., Muñoz, M., Rocha, F., Cuapio, P., & Meseguer, M. (2009). Fertilization rate and embryo quality is affected by sperm cryopreservation depending on fertilization procedure (IVF or ICSI). *Fertility and Sterility*, 92(3), S74.
- Lusignan, M. F., Li, X., Herrero, B., Delbes, G., & Chan, P. T. K. (2018). Effects of different cryopreservation methods on DNA integrity and sperm chromatin quality in men. *Andrology*, 6(6), 829–835. <https://doi.org/10.1111/andr.12529>
- Mahran, Z., Omran, T., Hashim, O., & Khodair, H. (2013). Evaluation of lipid peroxidation in cases of idiopathic male infertility: correlation with the hypo-osmotic swelling test. *Egyptian Journal of Dermatology and Venerology*, 33(2), 42. <https://doi.org/10.4103/1110-6530.123925>
- Martin Muñoz, P., Ferrusola, C. O., Vizuete, G., Dávila, M. P., Martínez, H. R., & Peña, F. J. (2015). Depletion of Intracellular Thiols and Increased Production of 4-Hydroxynonenal that Occur During Cryopreservation of Stallion Spermatozoa Lead to Caspase Activation, Loss of Motility, and Cell Death1. *Biology of Reproduction*, 93(6), 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.132878>
- Merino, O., Aguagüiña, W. E., Esponda, P., Risopatrón, J., Isachenko, E., Isachenko, V., & Sánchez, R. (2015). Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique. *Andrologia*, 47(2), 186–193. <https://doi.org/10.1111/and.12246>
- Minaei, M. B., Barbarestani, M., Nekoonam, S., Abdolvahabi, M. A., Takzare, N., Asadi,

- M. H., Hedayatpour, A., & Amidi, F. (2012). Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, *10*(2), 99–104.
- Miranda-Vizuete, A., Ljung, J., Damdimopoulos, A. E., Gustafsson, J. Å., Oko, R., Pelto-Huikko, M., & Spyrou, G. (2001). Characterization of Sptrx, a Novel Member of the Thioredoxin Family Specifically Expressed in Human Spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(34), 31567–31574.
- Mocé, E., Fajardo, A. J., & Graham, J. K. (2016). Human sperm cryopreservation. *EMJ*, *1*(1), 86–91.
- Moreau, J., Fargeon, S., Gatimel, N., Parinaud, J., & Léandri, R. D. (2019). Expression of phospholipase PLC Zeta in human spermatozoa: impact of cryopreservation. *Andrology*, *7*(3), 315–318. <https://doi.org/10.1111/andr.12593>
- N. M. Gulaya, V. M. Margitich, N. M. (2001). Phospholipid Composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Archives of Andrology*, *46*(3), 169–175. <https://doi.org/10.1080/01485010151096405>
- Nallella, K. P., Sharma, R. K., Allamaneni, S. S. R., Aziz, N., & Agarwal, A. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility*, *82*(4), 913–918. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.126>
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *59*, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>
- Nijs, M., & Ombelet, W. (2001). Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility*, *4*(3), 158–163. <https://doi.org/10.1080/1464727012000199232>
- Niki, E. (2015). *Evidence for beneficial effects of vitamin E*. 571–579.
- Noblanc, A., Damon-Soubeyrand, C., Karrich, B., Henry-Berger, J., Cadet, R., Saez, F., Guiton, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Alvarez, J. G., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2013). DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radical Biology and Medicine*, *65*, 719–723. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.044>
- Nowicka-Bauer, K., & Nixon, B. (2020). Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants*, *9*(2), 134. <https://doi.org/10.3390/antiox9020134>
- O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, *17*(3), 704–709. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>
- O'Flaherty, C. (2014a). Peroxiredoxins: Hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa. In *Basic and Clinical Andrology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 1–10). <https://doi.org/10.1186/2051-4190-24-4>
- O'Flaherty, C. (2014b). The Enzymatic Antioxidant System of Human Spermatozoa. *Advances in Andrology*, *2014*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/626374>

- O'Flaherty, C., & Matsushita-Fournier, D. (2017). Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa†. *Biology of Reproduction*, 97(4), 577–585. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox104>
- Okada, Y., Ishimaru, A., Suzuki, R., & Okuyama, T. (2004). A New Phloroglucinol Derivative from the Brown Alga *Eisenia bicyclis*: Potential for the Effective Treatment of Diabetic Complications. *Journal of Natural Products*, 67(1), 103–105. <https://doi.org/10.1021/np030323j>
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, 12(4), 417–435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Ounjai, P., Kim, K. D., Lishko, P. V., & Downing, K. H. (2012). Three-Dimensional Structure of the Bovine Sperm Connecting Piece Revealed by Electron Cryotomography1. *Biology of Reproduction*, 87(3), 1–9.
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Levine, M., Dutta, A., & Dutta, S. K. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>
- Palomar Rios, A., & Molina Botella, I. (2019). Causes and Impact of Cryopreservation-Associated Damage on Different Parameters of Human Spermatozoa and its Clinical Impact. *European Medical Journal*, 5(August), 100–109.
- Park, J. H., Kim, S. K., Kim, J., Kim, J. H., Chang, J. H., Jee, B. C., & Kim, S. H. (2015). Relationship between phospholipase C zeta immunoreactivity and DNA fragmentation and oxidation in human sperm. *Obstetrics & Gynecology Science*, 58(3), 232. <https://doi.org/10.5468/ogs.2015.58.3.232>
- Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*, 92(3–4), 255–266. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(00)01072-8)
- Peeker, R. (1997). Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 3(12), 1061–1066.
- Petersen, S. V., Oury, T. D., Ostergaard, L., Valnickova, Z., Wegrzyn, J., Thøgersen, I. B., Jacobsen, C., Bowler, R. P., Fattman, C. L., Crapo, J. D., Enghild, J. J., Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) Binds to Type I Collagen and Protects Against Oxidative Fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 13705–13710.
- Quéguineur, B., Goya, L., Ramos, S., Martín, M. A., Mateos, R., & Bravo, L. (2012). Phloroglucinol: Antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8), 2886–2893. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.026>
- Raad, G., Lteif, L., Lahoud, R., Azoury, J., Azoury, J., Tanios, J., Hazzouri, M., & Azoury, J. (2018). Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. *Andrology*, 6(6), 836–845. <https://doi.org/10.1111/andr.12531>
- Rao, B., & David, G. (1984). Improved recovery of post-thaw motility and vitality of

- human spermatozoa cryopreserved in the presence of dithiothreitol. *Cryobiology*, 21(5), 536–541. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90052-X](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90052-X)
- Rhee, S. G. (2016). *Overview on Peroxiredoxin*. 39(1), 1–5.
- Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., & Mahdi, F. (2014). The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14(2), 157–165.
- Rozati, H., Handley, T., & Ja. (2017). Process and Pitfalls of Sperm Cryopreservation. *Journal of Clinical Medicine*, 6(9), 89. <https://doi.org/10.3390/jcm6090089>
- Saleh, A., Kashir, J., Thanassoulas, A., Safieh-Garabedian, B., Lai, F. A., & Nomikos, M. (2020). Essential Role of Sperm-Specific PLC-Zeta in Egg Activation and Male Factor Infertility: An Update. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00028>
- Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-12>
- Schröter, S., Osterhoff, C., McArdle, W., & Ivell, R. (1999). The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction Update*, 5(4), 302–313.
- Shaman, J. A., & Ward, W. S. (2006). Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In C. J. De Jonge & C. Barratt (Eds.), *The Sperm Cell* (Issue January 2006, pp. 31–48). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545115.003>
- Sharma, R., Kattoor, A. J., Ghulmiyyah, J., & Agarwal, A. (2015). Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(1), 1–12. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.976720>
- Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H., & Hama, Y. (2008). Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *Journal of Applied Phycology*, 20(5), 705–711. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9254-8>
- Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K., & Nakamura, T. (2004). Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 16(4), 291–296.
- Shibata, T., Nagayama, K., Sugiura, S., Makino, S., Ueda, M., & Tamaru, Y. (2015). Analysis on Composition and Antioxidative Properties of Phlorotannins Isolated from Japanese *Eisenia* and *Ecklonia* Species. *American Journal of Plant Sciences*, 06(15), 2510–2521. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.615253>
- Silber, S. (2018). Fundamentals of male infertility. In *Fundamentals of Male Infertility*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-76523-5>
- So, M. J., & Cho, E. J. (2014). Phloroglucinol Attenuates Free Radical-induced Oxidative Stress. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(3), 129–135. <https://doi.org/10.3746/pnf.2014.19.3.129>

- Springate, L., & Frasier, T. R. (2017). Gamete compatibility genes in mammals: Candidates, applications and a potential path forward. *Royal Society Open Science*, 4(8). <https://doi.org/10.1098/rsos.170577>
- Sullivan, R., & Mieuisset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 22(5), 574–587.
- Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., & Burton, P. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(2), 184–189. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60254-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60254-4)
- Teclé, E., & Gagneux, P. (2015). Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular Reproduction and Development*, 82(9), 635–650. <https://doi.org/10.1002/mrd.22500>
- Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Zieschang, J.-A., & Clark, A. M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24(9), 2061–2070. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep214>
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 4–15.
- Turner, R. M. (2006). Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(1–2), 25–38. <https://doi.org/10.1071/RD05120>
- Vendrame, W. A., & Faria, R. T. (2011). Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.018>
- Villaverde, A. I. S. B., Netherton, J., & Baker, M. A. (2019). From Past to Present: The Link Between Reactive Oxygen Species in Sperm and Male Infertility. *Antioxidants*, 8(12), 616. <https://doi.org/10.3390/antiox8120616>
- Wagner, H., Cheng, J. W., & Ko, E. Y. (2018). Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001>
- Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. J., & Loughlin, K. R. (1997). Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 49(6), 921–925. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(97\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(97)00070-8)
- Ward, W. S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction*, 16(1), 30–36.
- World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf;jsessionid=C0E0B54DD18A11B8569203B2D5CA427A?sequence=1
- Wright, C., Milne, S., & Leeson, H. (2014). Sperm DNA damage caused by oxidative

stress: Modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(6), 684–703.

Zegers-Hochschild, F., Schwarze, J. E., Crosby, J. A., Musri, C., & Urbina, M. T. (2017). Assisted reproductive techniques in Latin America: The Latin American registry, 2014. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*, 21(3), 164–175.

Zegers-Hochschild, F., Schwarze, J. E., Crosby, J. A., Musri, C., & Urbina, M. T. (2019a). Assisted reproductive techniques in latin america: The latin american registry, 2015. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*, 23(2), 143–153.

Zegers-Hochschild, F., Schwarze, J. E., Crosby, J., Musri, C., & Urbina, M. T. (2019b). Assisted reproductive techniques in latin america: The latin american registry, 2015. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*, 23(2), 143–153.

Zribi, N., Chakroun, N. F., Ben Abdallah, F., Elleuch, H., Sellami, A., Gargouri, J., Rebai, T., Fakhfakh, F., & Keskes, L. A. (2012). Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. *Cryobiology*, 65(3), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.09.003>

ANEXOS 1

Parámetros	Media ± ES (Rango)
Edad(años)	35 ± 1.60 (21- 48)
Volumen (mL)	2. 60 ± 0.13 (1.50 - 4)
Concentración espermática (x10 ⁶ /mL)	70.79 ± 11.12 (16-218)
Número de espermatozoides por eyaculado (x10 ⁶ /eyaculado)	188.66 ± 3.27 (40 - 654)
Motilidad progresiva (%)	59.59 ± 3.92 (32- 90)
Motilidad Total (%)	64.68 ± 3.89 (40 - 95)
Vitalidad	80.55 ± 2.39 (60-96)
Morfología (%)	8.27 ± 0.35 (7-14)
Fragmentación de ADN (%)	13.22 ± 0.82 (7-23)
Número de Células redondas (x10 ⁶ /mL)	1.33 ± 0.19 (0.10 – 3)
pH	7.72 ± 0.06 (7.50 – 8.50)

Tabla 1. Características seminales de las muestras incluidas en el estudio

Parámetros	0 µg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
Motilidad Progresiva (%)	15.60 ± 2.00	19.20 ± 2.26*	16.50 ± 1.70	14.00 ± 1.70
Motilidad Total (%)	19.20 ± 2.15	23.00 ± 2.48	20.00 ± 2.00	17.80 ± 2.05
F.C Motilidad progresiva (%)	25.80 ± 3.02	31.70 ± 2.73*	29.10 ± 3.38	23.80 ± 2.46
F.C Motilidad total (%)	29.5 ± 3.06	34.6 ± 2.50	31.8 ± 3.44	27.3 ± 2.48
Vitalidad (%)	35.40 ± 2.06	38.60 ± 2.78	38.00 ± 2.46	37.40 ± 2.79
Fragmentación de ADN (%)	29.8 ± 1.89	27.3 ± 2.11*	25.7 ± 1.94***	24.7 ± 1.86**

Los valores son la media ± ES (Error estándar)
 F.C= Factor de criosupervivencia
 *P<0.05 Comparaciones múltiples con T de student para muestras dependientes.
 **P<0.01 Comparaciones múltiples con T de student para muestras dependientes.
 ***P<0.001 Comparaciones múltiples con T de student para muestras dependientes.

Tabla 2. Motilidad, Viabilidad y Fragmentación de ADN Espermático de las muestras suplementadas con floriglucinol.

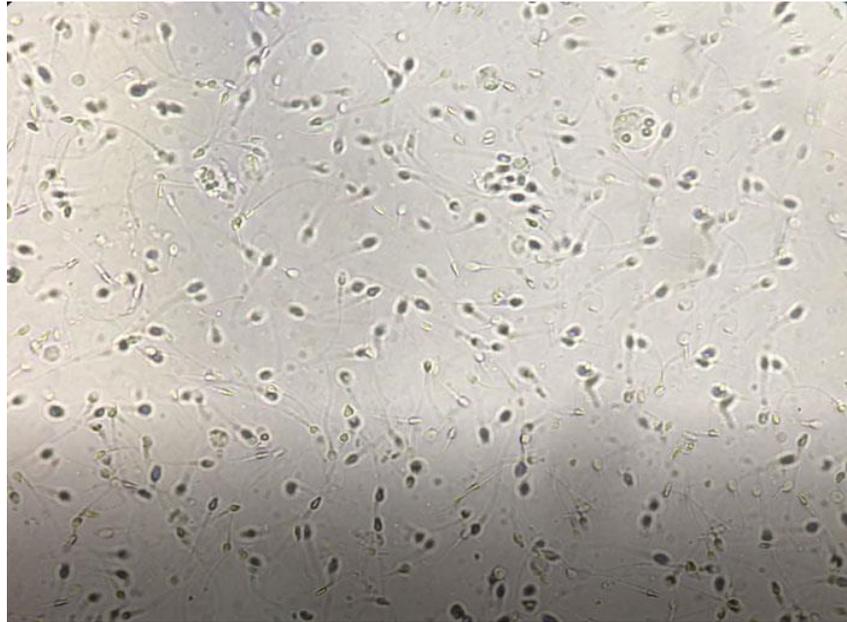


Figura 1. Evaluación de la motilidad espermática, del semen fresco, con un microscopio de campo claro a 400 aumentos (objetivo de 40x).

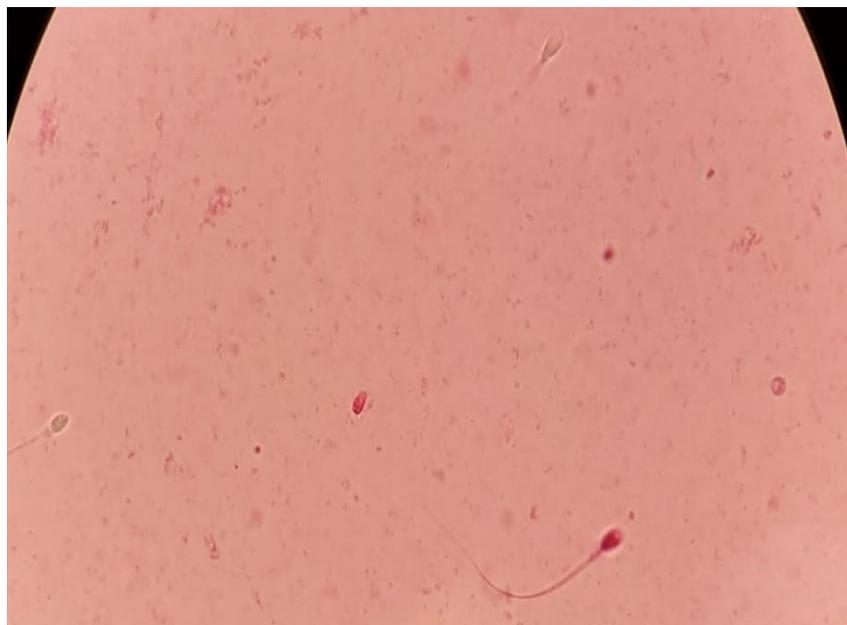


Figura 2. Vitalidad espermática evaluada con eosina a 400 aumentos bajo microscopio de campo claro.

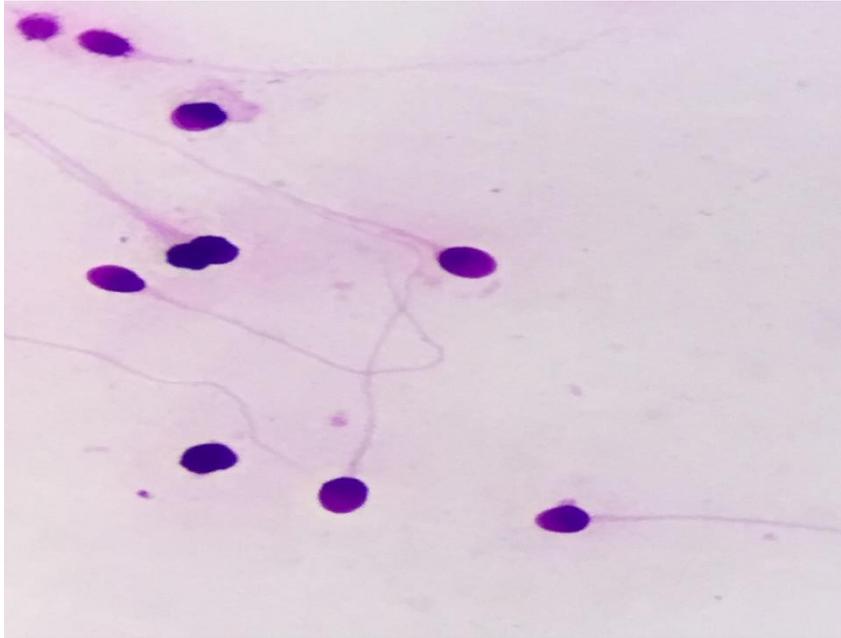


Figura 3. Morfología espermática evaluada a 400 aumentos bajo microscopio de campo claro.

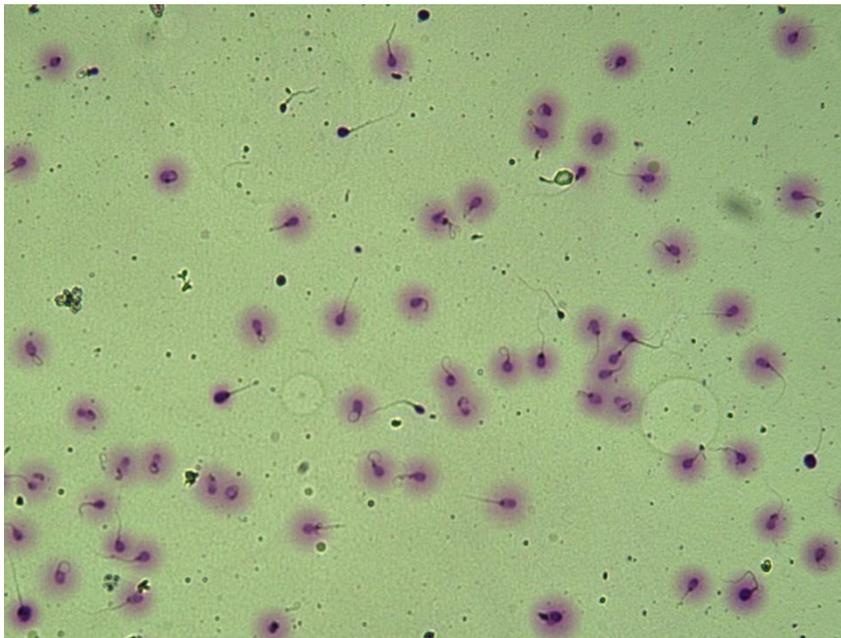


Figura 4. Fragmentación de ADN espermático evaluado a 400 aumentos, bajo microscopio de campo claro.

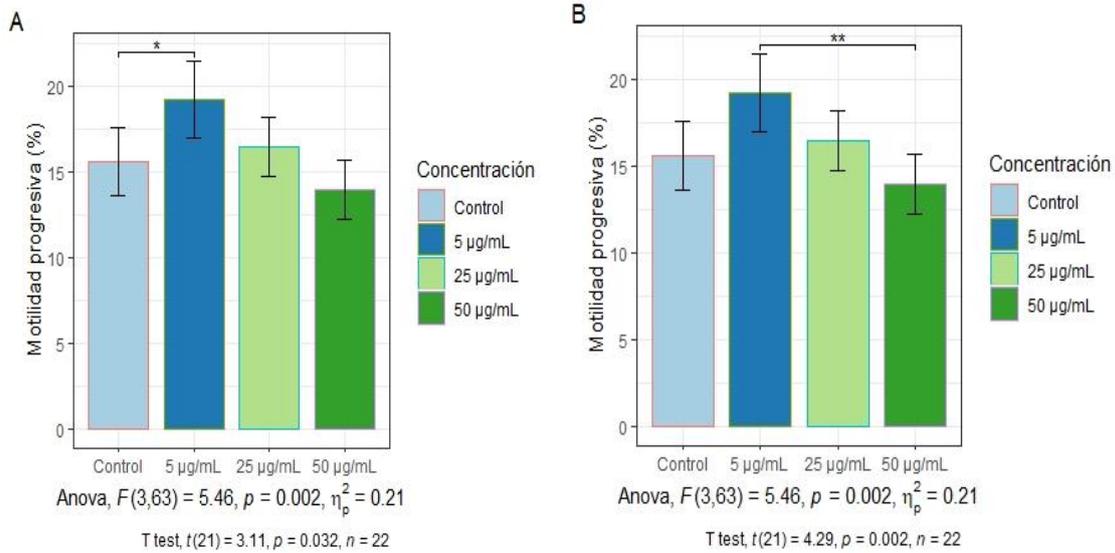


Figura 5. Motilidad progresiva post descongelación de las muestras congeladas con floroglucinol. A) * Anova de medias repetidas, 5 µg/mL comparado con el control, $p=0.032$. B) ** Anova de medias repetidas, 50 µg/mL comparado con 5 µg/mL, $p=0.002$.

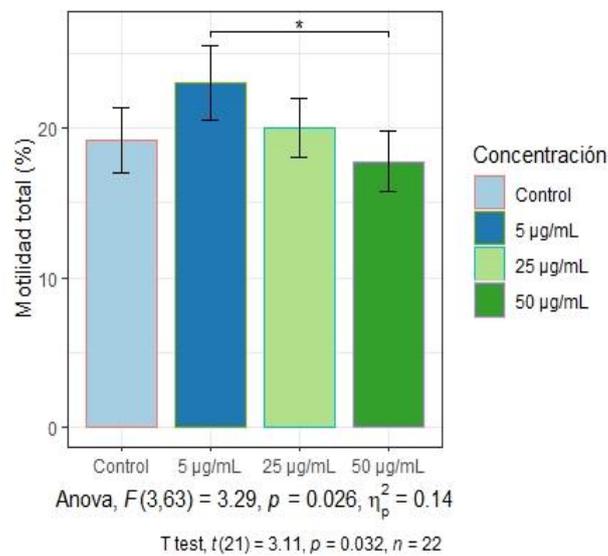


Figura 6. Motilidad Total post descongelación de las muestras congeladas con floroglucinol. * Anova de medias repetidas, 50 µg/mL de floroglucinol comparado con 5 µg/mL, $p=0.032$.

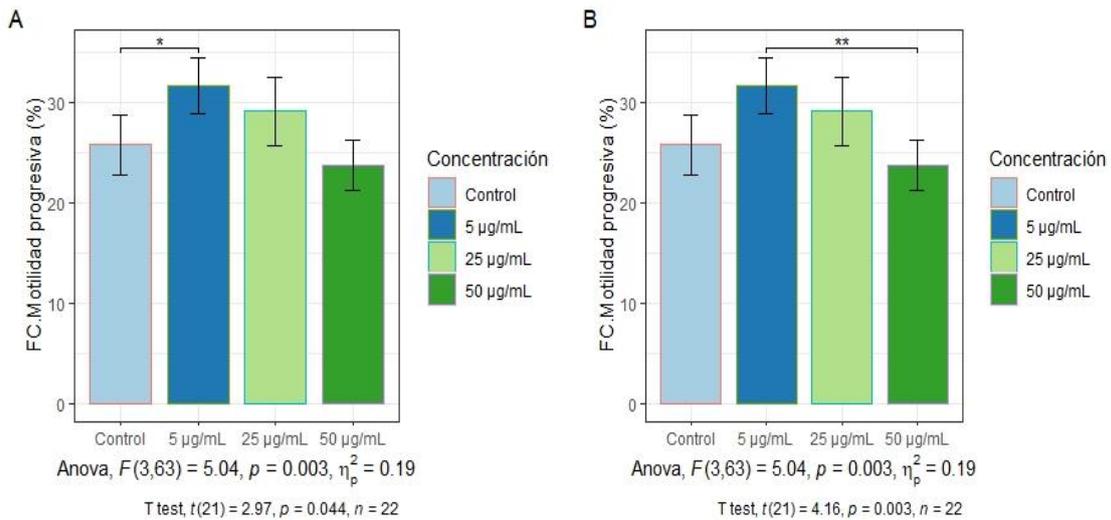


Figura 7. Factor de criosupervivencia de la motilidad progresiva post descongelación de las muestras congeladas con floroglucinol. A) * Anova de medias repetidas, 5 µg/mL comparado con el control, $p=0.044$. B) ** Anova de medias repetidas, 50 µg/mL comparado con 5 µg/mL, $p=0.003$.

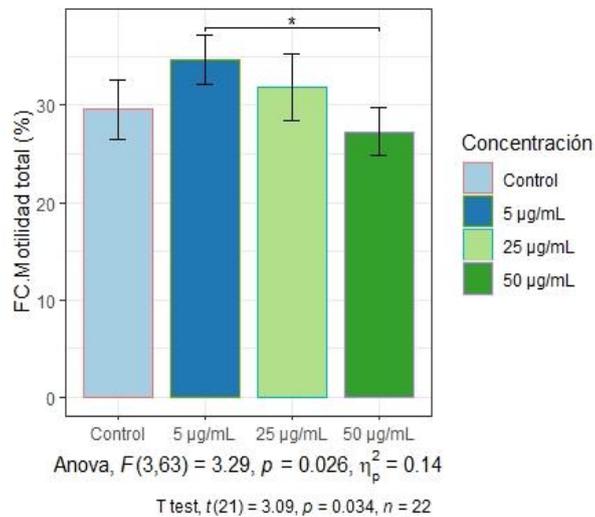


Figura 8. Factor de criosupervivencia de la motilidad total post descongelación de las muestras congeladas con floroglucinol. * Anova de medias repetidas, 50 µg/mL comparado con 5 µg/mL, $p=0.034$.

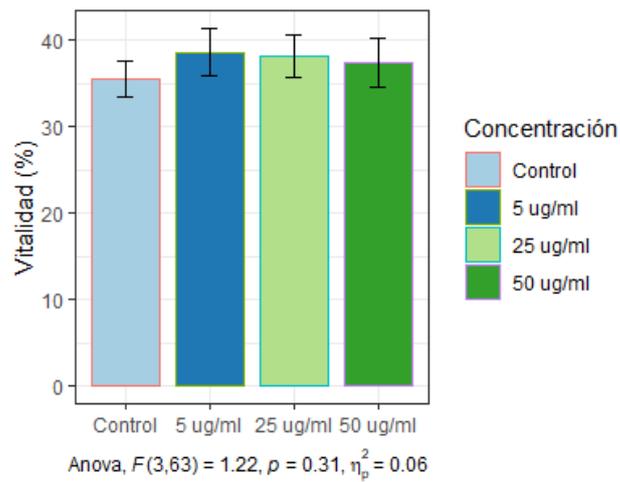


Figura 9. Vitalidad post descongelación de las muestras congeladas con floroglucinol. Anova de medias repetidas, $p=0.31$.

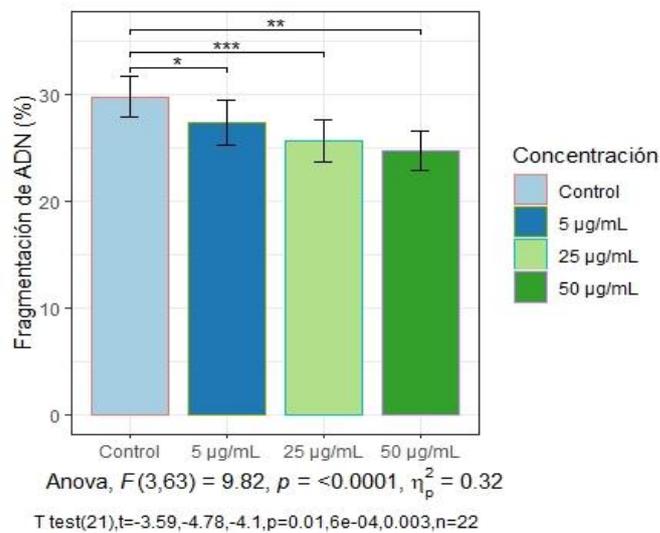


Figura 10. Fragmentación post descongelación de las muestras congeladas con floroglucinol. Anova de medias repetidas, *5 µg/mL comparado con el control, $p=0.01$. ***25 µg/mL comparado con el control, $p=0.0006$. **50 µg/mL comparado con el control, $p=0.003$.

ANEXO 2



Lima 2 de octubre 2020

Estimado

Dr. Tomas Agurto Sáenz

Jefe de la oficina de grados y títulos

Presente.

Por la presente manifestarle que el proyecto de tesis titulado "Efecto antioxidante de floroglucinol en la criopreservación de espermatozoides humanos" presentado por el Sr. José Luis Llanos Carrillo con DNI: 45489169 ha sido realizado en la Clínica Inmater en cooperación con el laboratorio de Biotecnología y fisiología animal de la Universidad Ricardo Palma, teniendo en cuenta todas las consideraciones pertinentes para la toma de muestra y análisis de calidad seminal de nuestros pacientes.

El uso de las muestras fue para uso único y exclusivo del proyecto de tesis "Efecto antioxidante de floroglucinol en la criopreservación de espermatozoides humanos", siendo los datos personales estrictamente confidenciales, sin develar la identidad de los pacientes que participaron en esta investigación.

Sin otro particular, me despido

Atentamente

Francisco Arturo Chung D.
Biólogo
CBP 6333



Tel: (01) 476-2727
informes@inmater.pe
Av. Guardia Civil 655 - Corpac - San Borja

www.inmater.pe

CLINICA INMATER Y UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Consentimiento informado para proyecto de investigación

Este documento va dirigido a varones mayores de 17 años y menores de 51 de la ciudad Lima - Perú, a los cuales se les invita a participar en la investigación: EFECTO ANTIOXIANDTE DE FLOROGLUCINOL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Investigador Principal: Bach. José Luis Llanos Carrillo

Patrocinador: Clínica Inmater – Universidad Ricardo Palma

Soy José Luis Llanos Carrillo identificado con el documento de identidad N° 45489169; estoy realizando una investigación sobre la criopreservación de espermatozoides humanos, que es una técnica utilizada por los centros de reproducción asistida en nuestro país y el mundo para preservar la fertilidad de los varones para posteriormente ser usada en un tratamiento de reproducción asistida.

La invitación a participar en esta investigación es voluntaria y no necesariamente implica que usted u otros miembros de su familia padezcan o sufran de una enfermedad particular o tengan un riesgo genético para esta.

El propósito de la investigación es probar el antioxidante denominado floroglucinol en la criopreservación de espermatozoides humanos y determinar el efecto beneficioso que esta pueda tener durante la criopreservación de espermatozoides.

Su participación incluye la donación de una muestra seminal voluntaria obtenida por masturbación en un frasco de toma de muestra de boca ancha, después de un periodo de abstinencia de 3 a 5 días y una entrevista personal donde se le preguntará datos personales que se mantendrá de forma confidencial.

Esta investigación obtendrá resultados referentes a la calidad seminal que usted presente antes y después de la criopreservación; esta información podrá ser compartida con usted si lo requiere. Nosotros no compartiremos la identidad de aquellas personas que participen en la investigación.

Por lo expuesto anteriormente se afirma que la participación es estrictamente voluntaria e incluye el derecho a negarse a participar en el proyecto. El participante tendrá derecho a retirarse da la investigación cuando lo desee y no habrá ningún tipo de sanción o represalias.

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por la Clínica Inmater cuya tarea es asegurarse de que se proteja la información confidencial de los participantes y no presenten daños o prejuicios antes, durante y después de la investigación. Si usted desea averiguar más

sobre el proyecto contacte personalmente con la Clínica Inmater ubicada en la AV. Guardia Civil 655, San Borja a través del correo electrónico: informes@inmater.pe o al teléfono: (01) 476-2727.

Yo _____ identificado con el documento de identidad N° _____ he leído la información brindada en esta carta. He tenido la oportunidad de realizar preguntas con respecto al proyecto y he aclarado mis dudas satisfactoriamente. Voluntariamente doy mi consentimiento para utilizar mi muestra seminal en la investigación EFECTO ANTIOXIANDTE DE FLOROGLUCINOL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Firma

Fecha

Huella digital