

# Integridad de ADN espermático

## Integrantes:

Alarcón, Pablo

Brienza, Ivana

Cámpora, Trinidad

Capocasa, Julieta

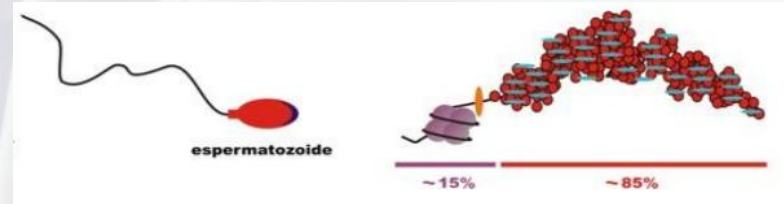
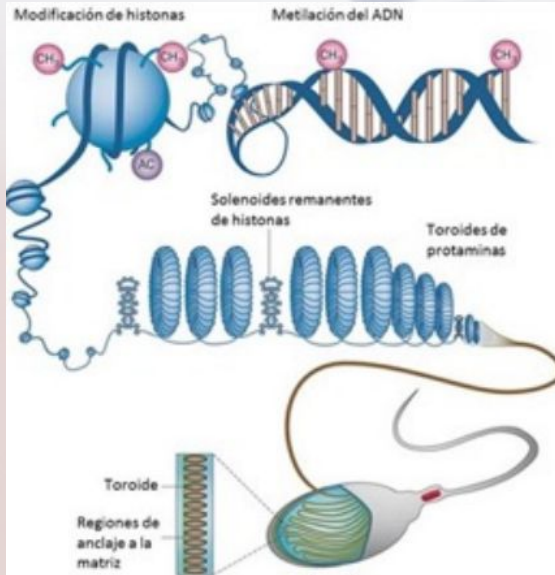
Masiá Rojkín, María Paz

Scataglini, Molys

- grupo 4 -

## ADN espermático normal

- Cromatina altamente compactada ➡ asociaciones entre ADN y protaminas (Arg, Cys)

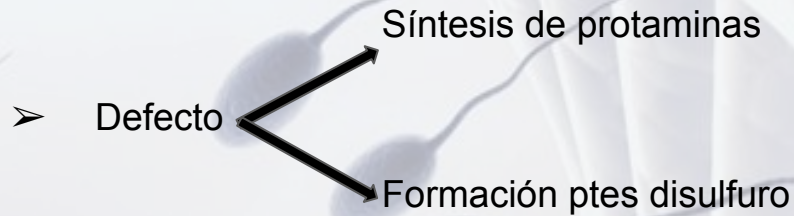


Los hombres infértiles tienen un aumento de la histona espermática (compactación más pobre de la cromatina y ↑ susceptibilidad a tensiones externas)

- ADN del espermatozoide ➡ 6 veces más condensado que el de los cromosomas mitóticos

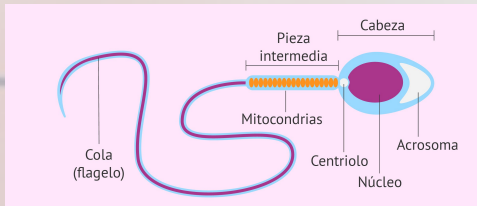
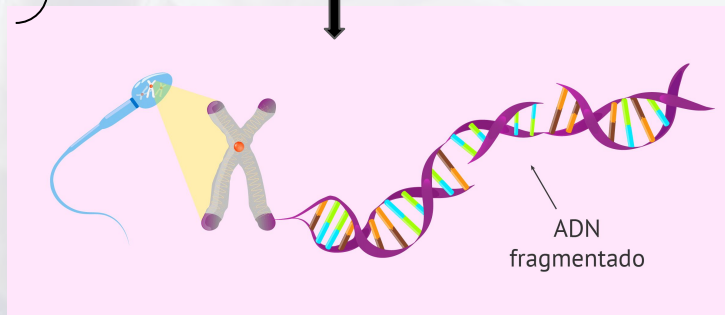


material genético protegido durante el paso a lo largo de los aparatos genitales masculino y femenino



Afecta empaquetamiento cromatina

↑Vulnerabilidad



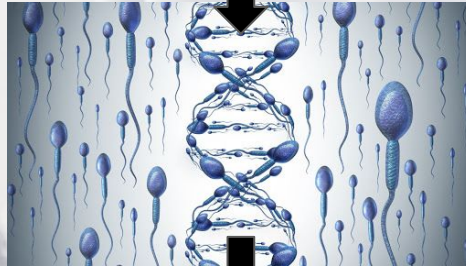
- ➔ ↑ tasa de mutación
- ➔ su volumen está relacionado con la movilidad espermática
- ➔ Mutaciones o deleciones ➔ movilidad espermática reducida
- ➔ Importancia en la evaluación de la infertilidad masculina

➤ Parámetros para evaluación  
clínica de la fertilidad masculina:

- Concentración
- Movilidad
- Morfología



hombres que se encuentran dentro de los rangos normales de la OMS

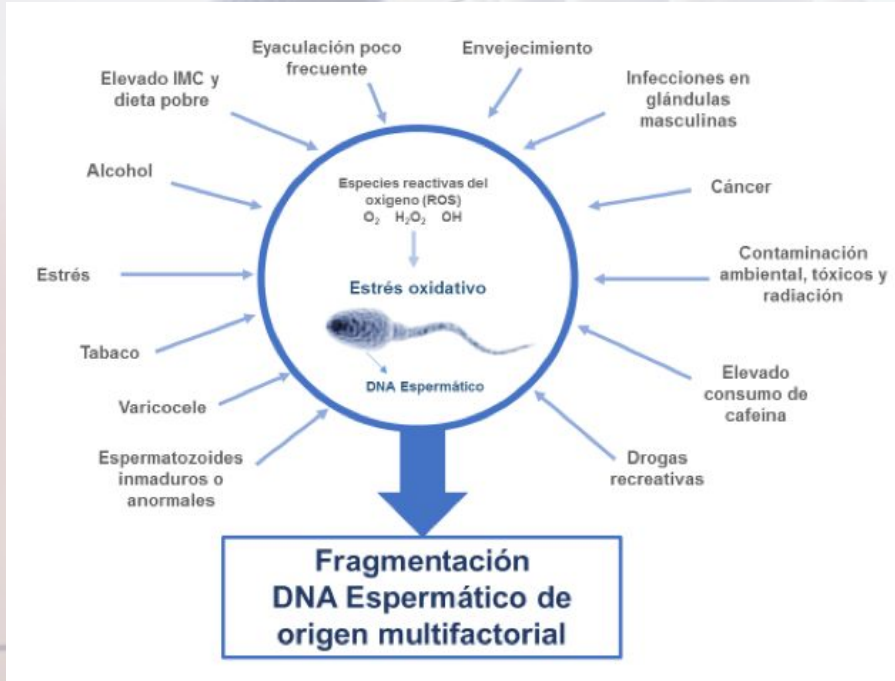


Técnicas de la **medida de la integridad del ADN espermático**

Los resultados pueden orientar la selección de opciones de tratamiento y los servicios de fertilidad

## Daño del ADN espermático

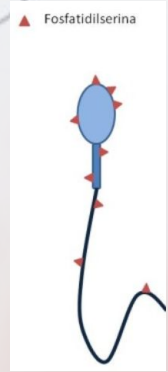
- Fenómeno multifactorial que puede afectar tanto al ADN mitocondrial como al nuclear. Algunos factores que pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto masculino, lo hacen durante la producción o el transporte de las células espermáticas:



Estas alteraciones pueden incluir anomalías en la condensación de la cromatina y en la integridad de la molécula del ADN cuando presenta rupturas tanto de doble como de simple cadena y también anomalías cromosómicas

# Mecanismos principales de daño del ADN espermático:

## i. Apoptosis durante la espermatogénesis



- Células seleccionadas (marcadores apoptóticos tipo Fas) ➡ fagocitadas y eliminadas por la célula de Sertoli
- La apoptosis selectiva previene la sobreproliferación de las células y aborta selectivamente espermatozoides anormales ➡ Si este mecanismo no funciona, un porcentaje de estas células germinales defectuosas entra al proceso de espermiogénesis apareciendo en el eyaculado ➡ células germinales que tengan el núcleo dañado por la apoptosis, pueden formar espermatozoides morfológicamente normales

## ii. Roturas de la cadena del ADN durante el remodelado de la cromatina en la espermiogénesis

- Empaquetamiento cromatina ➡ actividad endógena de nucleasa para crear y ligar los nudos que proveen un "descanso" al estrés de la torsión de la cadena durante el desplazamiento de histonas por protaminas. Alteraciones que en el control de este proceso ➡ anomalías del empaquetamiento de la cromatina o nudos de ADN no reparados

## iii. Fragmentación post-testicular del ADN inducida por radicales de oxígeno durante el transporte a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo

- Espermatozoide inmaduro ➡ ↑ROS, que pueden dañar el ADN del espermatozoide maduro

#### **IV. Fragmentación del ADN por caspasas y endonucleasas.**

La activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas por las especies reactivas de oxígeno y otros factores fisicoquímicos induce fragmentación del ADN espermático.

#### **V. Daño al ADN por radioterapia y quimioterapia.**

El efecto citotóxico de la quimioterapia o radioterapia sobre el epitelio espermatogénico se cree que es el causante de la reducción de esperma y la consiguiente infertilidad masculina.

Se sabe que la edad avanzada y las gonadotoxinas en terapias contra el cáncer se han asociado con niveles reducidos de apoptosis de células germinales en el testículo y un mayor porcentaje de espermatozoides eyaculados con daño en el ADN, lo que sugiere que en estos hombres tanto la espermatogénesis como la apoptosis se han interrumpido.

#### **VI. Daño inducido por tóxicos ambientales.**

Estudios previos muestran la evidencia de una asociación entre la exposición a las altas concentraciones de contaminantes aéreos y el incremento del daño al ADN espermático.

# Técnicas utilizadas para evaluar el ADN espermático

## Ensayo de Túnel

- Permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos del ADN que quedan libres a causa de las rupturas de éste, bien sean de cadena simple o doble.
- La reacción se cataliza mediante la acción de una transferasa terminal. Esta enzima incorpora desoxiuridina, modificada con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada.
- El nucleótido incorporado está marcado con un fluorocromo.
- La señal es mayor cuanto mayor sea el grado de fragmentación del ADN.
- Esta técnica fue desarrollada para identificar una población apoptótica de espermatozoides en el eyaculado, sin embargo la fragmentación del ADN medida mediante el TÚNEL no está siempre asociada con un fenómeno apoptótico, ya que podría deberse a una maduración espermática defectuosa por un empaquetamiento incorrecto de la cromatina.

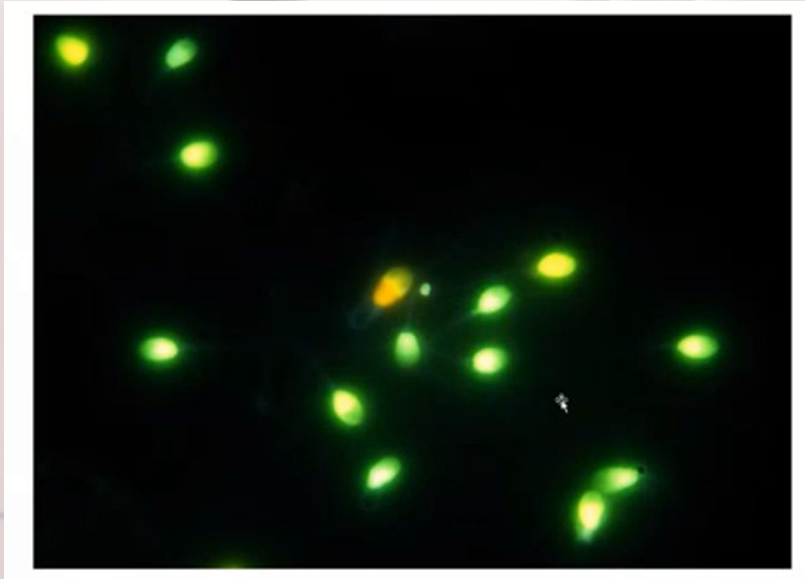
## Ensayo cometa

- Es una lectroforesis en gel de células individuales es un método sensible, rápido.
- para cuantificar daño en el ADN de células individuales.
- las células son sometidas a lisis mediante un agente reductor de grupos sulfidriilo de las protaminas que permite que el ADN fragmentado pueda migrar.
- Para visualizar el ADN que se separó de la célula, éste es teñido con sustancias fluorescentes
- Las células con mayor daño del ADN muestran una migración aumentada desde el núcleo hacia el ánodo, generando una imagen similar a la cola de un cometa.
- La presencia de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud de la cola.



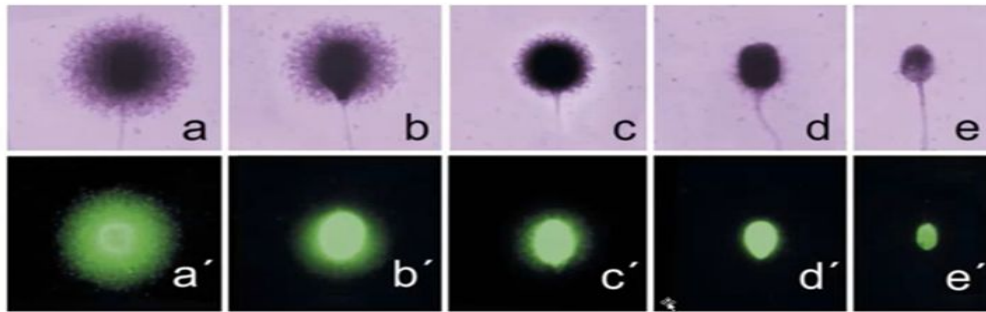
## Ensayo de la estructura cromatínica del espermatozoide (SCSA)

- Desnaturaliza la molécula de ADN mediante una solución ácida o mediante un tratamiento con calor y una vez desnaturalizada se tiñe con naranja de acridina.
- Se intercala entre las dos cadenas de ADN y al ser excitado emite una longitud de onda de 530 nm y se visualiza de color verde, mientras que al intercalarse en el ADN de cadena sencilla (ADN desnaturalizado) emite una longitud de onda de 640 nm de color rojo.
- Las células se separan y leen por citometría de flujo.
- El ADN fragmentado es más susceptible a ser desnaturalizado y por tanto se visualiza en color rojo.



## Dispersión de la cromatina espermática (SCD)

- consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen.
- Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido seguido de una desprotección, de forma que los espermatozoides con fragmentación no generan un halo de dispersión de la cromatina. Los que no están fragmentados dan lugar a grandes halos de dispersión.
- Se valora el tamaño de los halos de dispersión mediante microscopía de campo claro o de fluorescencia.
- Es posible reconocer la presencia de fragmentación del ADN de la siguiente forma: cabezas de espermatozoides con halos grandes o medianos significan que no hay daño en el ADN espermático, mientras que aquellos con halos pequeños o sin ellos sugieren un daño en el ADN.



*Los zoides etiquetados como a y b, tienen su ADN integro, el resto presentan ADN fragmentado*

## **Ensayo In Situ Nick Translation (ISNT)**

El análisis ISNT, cuantifica la incorporación dUTP (desoxiuridín trifosfato) biotinilado en las rupturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo NT detecta a los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN, estos resultados indican la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide. El estudio de la integridad nuclear espermática mediante el análisis NT evidencia una buena correlación con la movilidad y la morfología espermática, y en menor medida con la concentración de espermatozoides en el semen.

# METODOLOGÍAS CON COLORANTES INTRACATENARIOS

- **Prueba de naranja de acridina**

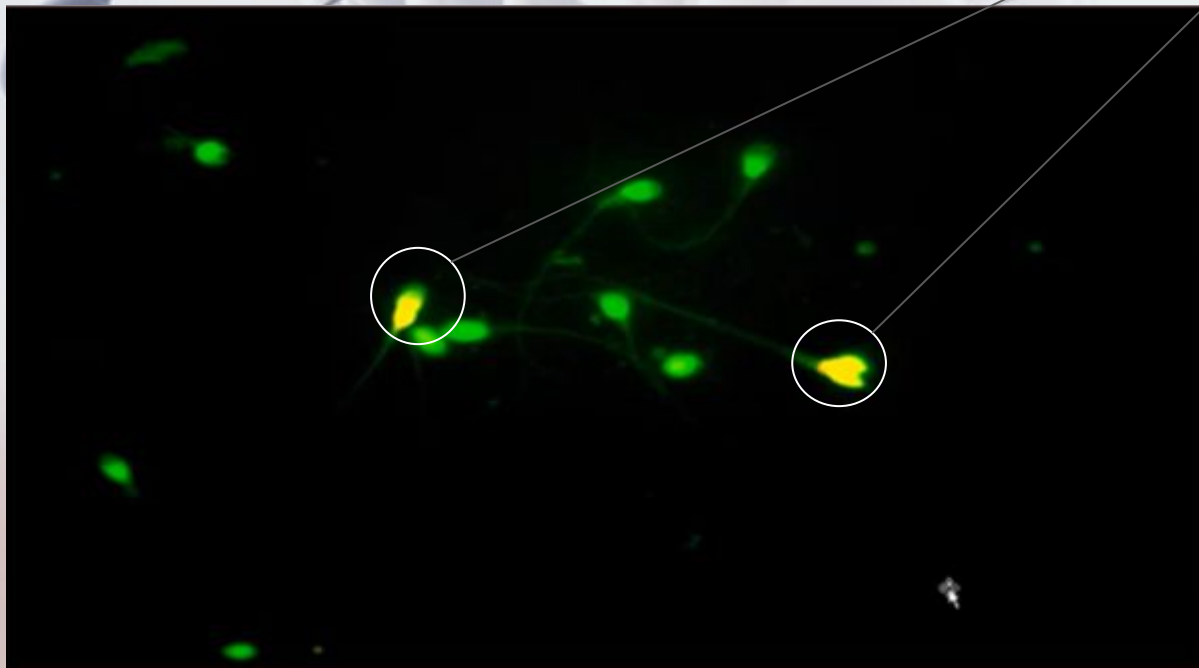
⇒ Utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina, se ha aplicado el mismo principio que el utilizado en el **SCSA** para visualizar los espermatozoides con DNA fragmentado empleando microscopía de fluorescencia.

⇒ Mide la desnaturalización del ADN ⇒ Los espermatozoides que tienen el ADN desnaturalizado se ven anaranjados y los que tienen las cadenas normales que no dejaron entrar el colorante se ven verdes.

⇒ **DESVENTAJAS:** - Subjetividad del observador en el momento de discriminar entre la emisión del color verde y el naranja de este fluorocromo, dado que existe toda una serie de colores intermedios.

- Resultados no parecen muy reproducibles, ya que parecen variar con el tiempo, y no distingue entre pacientes infértiles y donantes.

**ADN  
desnaturalizado**



- **Azul de Toluidina**

⇒ Colorante nuclear básico que genera reacciones metacromáticas cuando interacciona con la cromatina.

⇒ Se incorpora en cromatina rica en histonas, con abundancia de lisina, presenta una coloración violeta-azulada intensa, mientras que cuando lo hace a cromatina rica en protaminas presenta una coloración azul-pálida.

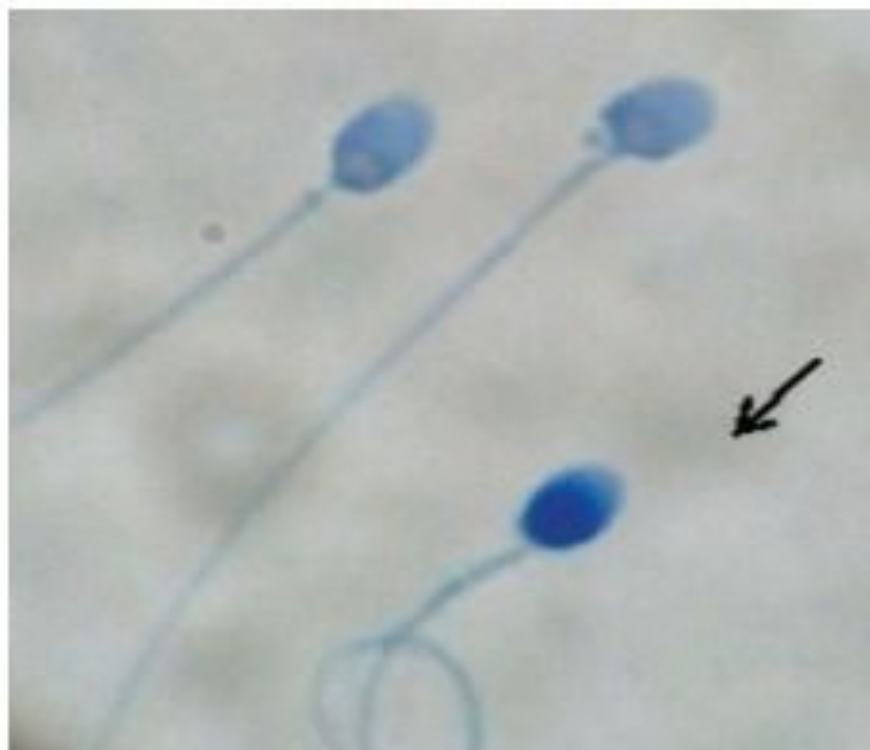
⇒ Prueba de maduración-condensación nuclear, y los espermatozoides con cromatina inmadura tendrían más habitualmente roturas del DNA.

⇒ **VENTAJAS:** -Proporcionar preparaciones permanentes para su uso en un microscopio ordinario, aunque las tinciones intermedias son de difícil valoración.

- Simple y de un bajo costo.

⇒ **DESVENTAJA:** Resultados poco reproducibles.

**Figura 2.** Tinción con Azul de Anilina. Los núcleos inmaduros adoptan una tinción azul fuerte (flecha), mientras que los núcleos maduros no tienen fuerte afinidad por el colorante. Fuente: Laboratorio REPROTEC.



- **Cromomicina A3(CMA3)**

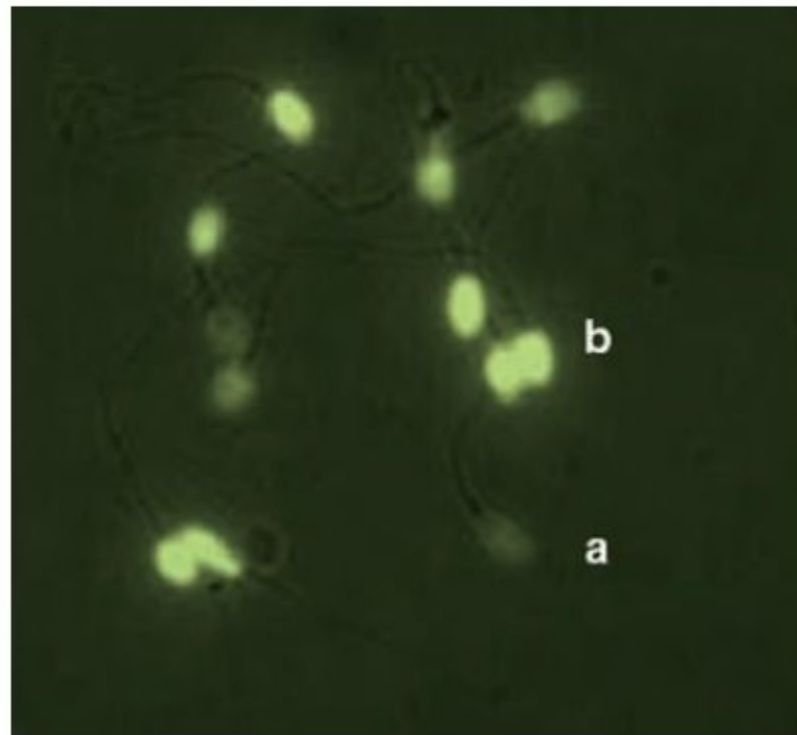
⇒ Fluorocromo ampliamente utilizado en citogenética debido a que produce una buena diferenciación longitudinal de los cromosomas, ya que se ancla específicamente a regiones ricas en guanina-citosina y compite por los mismos lugares en el DNA, que las protaminas.

⇒ Cuando los espermatozoides presentan una tinción intensa tras ser teñidos con CMA3, se interpreta que esta población celular muestra unos niveles bajos de protaminación ⇒ Revela espermatozoides que tienen un nivel deficiente de empaquetamiento en su cromatina, siendo también una prueba de maduración-condensación nuclear.

⇒ **DESVENTAJA:** -Subjetividad del observador a la hora de establecer los grupos de clasificación.

⇒ Prueba de elección frente a la naranja de acridina o derivados de la toluidina para el análisis de la maduración nuclear del espermatozoide.

**Figura 1.** Tinción con CMA3. Los núcleos maduros se ven de color verde opaco (a), mientras que los núcleos inmaduros (sin protaminas) se ven de color verde brillante (b). Fuente: Laboratorio REPROTEC.



## Impacto del daño en el ADN espermático y los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA)

- El éxito de las TRA depende de múltiples factores, y entre ellos la integridad estructural y funcional de los gametos usados.
- Se ha demostrado que una fracción elevada de espermatozoides con defectos en la cromatina puede tener un impacto negativo en los resultados de las TRA.
- Con frecuencia las muestras de semen que muestran altos niveles de daño en el ADN están asociadas a una disminución de las tasas de fertilización o implantación después de FIV/ICSI, y pueden dar lugar a mala calidad embrionaria, bloqueo embrionario o aborto.
- Aunque en estos procedimientos se seleccionan los espermatozoides de mejor motilidad y morfología, siempre hay un porcentaje de los mismos que contienen varios grados de daño en el ADN y que pueden alcanzar el ovocito con un mínimo o ningún esfuerzo (FIV o ICSI).
- Se han correlacionado los valores de fragmentación con los resultados de las TRA para intentar establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir el resultado de las mismas ⇒ Aumentar notablemente las tasas de éxito, reducir el número de ciclos innecesarios y conseguir finalmente una eficiencia mayor de la técnica de reproducción asistida empleada.

# Criopreservación de gametas

**Integrantes:**

Alarcón, Pablo

Brienza, Ivana

Cámpora, Trinidad

Capocasa, Julieta

Masiá Rojkín, María Paz

Scataglini, Molys

## **CONCEPTO**

Es un procedimiento técnico a través del cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, ( $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$ ) para disminuir sus funciones vitales manteniéndolos en condiciones de vida suspendida por un tiempo prolongado.

## **OBJETIVO**

Mantener la viabilidad y funcionalidad de los gametos a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo hasta su posible utilización en tratamientos de reproducción asistida. Además se mantienen sus propiedades biológicas una vez descongeladas sin que se vea afectada su microestructura o su funcionalidad.

## UTILIDAD

La criopreservación de gametos es un recurso que se utiliza frecuentemente en las clínicas de reproducción asistida. Por un lado, es el método utilizado para preservar el semen o los óvulos donados para tratamientos de otras parejas que los pueden necesitar. Pero además, es una manera de preservar los propios gametos para ser utilizados para uno mismo en el futuro.

## RAZONES

La capacidad reproductiva puede verse afectada con facilidad por factores que van desde la edad hasta las patologías médicas, oncológicas y no oncológicas, las cuales disminuyen la reserva ovárica y espermatogénesis. Los tratamientos de quimioterapia y radioterapia son muy agresivos y pueden atacar a las células precursoras de óvulos y espermatozoides.

Propuesta inicialmente para pacientes oncológicos, la preservación de la fertilidad ha invadido otros campos médicos (enfermedades reumatológicas y autoinmunes) y padecimientos que podrían reducir la fertilidad por sí mismos o como consecuencia de sus tratamientos; también se ha enfocado en pacientes que por motivos sociales retrasan la maternidad hasta el tiempo correcto, indicación que se considera la de mayor prevalencia hasta la fecha.

## FACTORES QUE AFECTAN AL HOMBRE

- Pacientes con baja calidad espermática, con un bajo recuento de espermatozoides y/o motilidad reducida de los mismos (oligozoospermia y astenozoospermia severa).
- Pacientes que sufren enfermedades sistémicas que pueden afectar a su fertilidad como son las enfermedades autoinmunes.
- Profesiones de riesgo reproductivo o vital.
- Donantes de espermia, es imprescindible que se congelen las muestras para realizar una serie de análisis antes de ser utilizadas para asegurar que no transmiten ninguna enfermedad.
- Transexuales que vayan a someterse a la cirugía de transición de sexo.
- Pacientes con dificultades para obtener la muestra. Algunos hombres presentan limitaciones a la hora de obtener la muestra el día de la inseminación artificial (IA) o de la fecundación in vitro (FIV).

## FACTORES QUE AFECTAN A LA MUJER

- En mujeres con patologías benignas del ovario que requieren múltiples cirugías (endometriosis recurrente) o que disminuyen la reserva ovárica.
- Previo a un tratamiento oncológico, ante la necesidad de la remoción de uno o ambos ovarios, o por el efecto sobre los mismos de la quimio o radioterapia en las que la estimulación de la ovulación no esté contraindicada.
- Ante la posibilidad de una futura menopausia prematura o aquellas que sufren enfermedades sistémicas que pueden afectar a su fertilidad (causas autoinmunes)
- en causas sociales como el deseo de postergación de la maternidad por motivos personales, laborales o en pacientes sin pareja, ya que la mujer nace con una cantidad finita de óvulos, que se va reduciendo con el tiempo ( también disminuye la calidad de los mismos).
- Para facilitar los procedimientos de donación de óvulos.

# INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN.

HOMBRE	MUJER
<p data-bbox="189 445 948 554">La edad no influye en los resultados de la criopreservación espermática.</p> <p data-bbox="189 631 948 805">El factor que mejor permite prever el resultado de la congelación es la calidad espermática previa.</p>	<p data-bbox="981 396 1734 494">No hay una edad límite para congelarlos, se puede hacer cuando se desee.</p> <p data-bbox="981 565 1734 718">Sin embargo, lo ideal es hacerlo cuando la mujer es joven y sus óvulos son de buena calidad.</p> <p data-bbox="981 789 1734 942">Mejores resultados: mujeres menores de 35 años, en las que la calidad y cantidad aún no tienen deterioro importante.</p>

# PROCEDIMIENTO

## Criopreservación espermática

Para congelar y guardar semen:

- No es necesario tomar medicación
- Recoger muestra con una abstinencia sexual de entre 3 y 5 días.
- Es necesario que el paciente aporte serologías actualizadas.

Una vez obtenida la muestra, se analiza la **calidad** → Espermograma.

Determinará la viabilidad una vez sea descongelada.

Requisito imprescindible: espermatozoides móviles.

La congelación y descongelación implica una cierta pérdida de la motilidad y la capacidad de fertilizar ---->influyen en la calidad del semen.

Factores que dañan al espermatozoide:

Choque térmico, formación de cristales de hielo, deshidratación, aumento de la cc de sal, choque osmótico.

Con la finalidad de evitar daños celulares en los espermatozoides→ **crioprotectores**.

Se congelan y se almacenan a -196°C.



1 Muestra de sangre para eliminar riesgo infeccioso



2 Entrega de muestra seminal



3 Análisis de la muestra seminal



4 Valoración de la muestra seminal



5 Inclusión de crioprotectores



6 Congelación a -196°C

Existen dos técnicas de congelación:

Congelación lenta→ la más utilizada.

Una vez añadidos los crioprotectores, la muestra se reparte en criotubos o en pajuelas, se va descendiendo la temperatura paulatinamente y finalmente se almacenan en nitrógeno líquido, a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

*-Muestras valiosas* (procedentes de pacientes oncológicos, biopsias testiculares, los lavados de semen de seropositivos): la congelación se puede realizar en pequeñas perlas---> administrarlas mejor y descongelar únicamente la cantidad necesaria.

Vitrificación→ Método de congelación ultrarrápida.

Se utiliza para la congelación de óvulos y embriones---> más sensibles a los procesos de congelación.

Los espermatozoides no son tan sensibles, son células muy pequeñas, por lo que al tener tan poco volumen no se pueden formar grandes cristales que pueden perjudicar posteriormente su estructura interna.

Ésta es la principal razón por la que la congelación lenta funciona bien en los espermatozoides y no hay necesidad de recurrir a la vitrificación espermática para obtener buenos resultados.

## **Criopreservación de óvulos**

Obtención de óvulos:

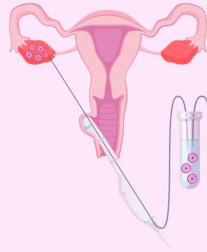
-**Estimulación ovárica:** administración de medicación hormonal--->desarrollo folicular múltiple en los ovarios.

-**Punción ovárica o folicular:** intervención quirúrgica muy sencilla para poder extraer los óvulos---> se van pinchando los folículos y aspirando el líquido de su interior, donde se encuentran los óvulos maduros.

Una vez obtenidos se evalúan (estado de maduración y calidad), se congelan y se almacenan.



Tratamiento de  
estimulación ovárica



Punción  
ovárica



Vitrificación de  
óvulos

## Factores que influyen en la congelación

**Óvulo**→ célula más grande del cuerpo humano, tiene alto contenido en agua, antes de su fecundación se encuentra en un estadio muy complejo (metafase II), en el que la división de su material genético se encuentra detenida.

→ Resulta extremadamente complicado congelarlos sin que resulten dañados.

-Bajas temperaturas→ despolimerización de los microtúbulos→ desorganización y dispersión de los cromosomas.

-Alto contenido en agua→ formación de cristales de hielo→ daños en estructuras internas y en membrana celular.

-Deshidratación excesiva durante la congelación→ colapso irreversible y muerte celular.



La técnica utilizada hoy en día para congelar óvulos es la **vitrificación**.

# MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN

## Congelación lenta de óvulos

- técnica tradicional para la congelación de óvulos y de embriones.
- desciende la temperatura poco a poco en un término de 2 horas, hasta lograr el congelamiento de la célula, al mismo tiempo que se deshidrata la célula con el uso de los crioprotectores.
- se necesita un congelador programable en el que la temperatura descenderá de forma gradual hasta una temperatura comprendida entre los  $-40$  y los  $-70$  °C → se consigue minimizar la formación de cristales de hielo.
- puede haber un efecto tóxico debido al tiempo de exposición prolongado a los crioprotectores.

A continuación, se sumergirán los óvulos en nitrógeno líquido, donde alcanzarán rápidamente los  $-196$  °C.

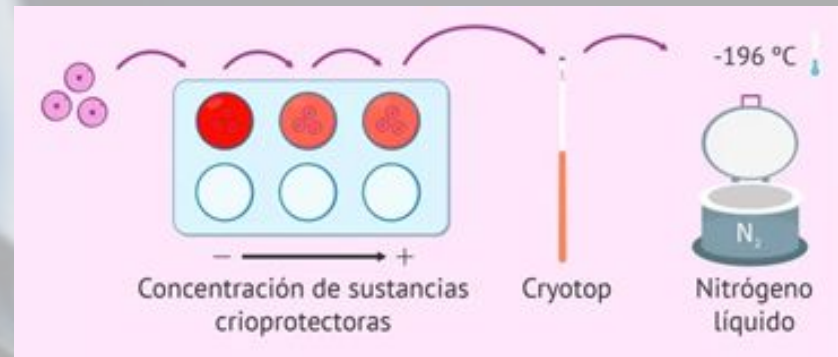
Para la *descongelación* de los óvulos, se extraen del nitrógeno líquido las pajuelas donde están contenidos, se mantienen 30 segundos a temperatura ambiente y se sumergen en un baño a  $31$  °C, donde se liberarán los óvulos del interior de la pajuela.

Los óvulos se rehidratan de forma secuencial en diferentes medios de cultivo, se eliminan los restos del crioprotector y finalmente recuperan su estructura normal.

- tasas de supervivencia después de la descongelación eran muy bajas por ello → ha sido prácticamente sustituido por la vitrificación.

## Vitrificación de óvulos

- técnica de congelación ultrarrápida.
- velocidad de enfriamiento de hasta 23.000 °C/min
- no lleva más de quince minutos realizarla.



Consiste en poner en contacto al gameto con nitrógeno líquido, lo que hace descender la temperatura bruscamente y evita los daños descritos con la congelación lenta, debido a un enorme incremento de la viscosidad manteniendo así la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación. Gracias a ello, el agua que hay en el interior celular no tiene tiempo a cristalizar, pasa de un estado líquido a un estado vítreo, un sólido amorfo.

→ requiere una alta concentración de crioprotectores para tener éxito.

Dos estrategias para evitar su toxicidad:

- Reducir al máximo el tiempo de exposición
- Utilizar el mínimo volumen de medio para vitrificar

Se sigue el mismo procedimiento para rehidratar la célula y eliminar los crioprotectores.

# TÉCNICA

Los ovocitos son equilibrados a temperatura ambiente en la solución que provee el kit (solución contiene etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO) en medio mínimo esencial (MEM) con hidroxipropilcelulosa (HPC) y sin suplemento proteico). Los ovocitos se deshidratan, se contraen y luego regresan a su morfología normal. Este proceso toma de 7 a 15 minutos, dependiendo de la calidad de cada ovocito.

Seguidamente los ovocitos son trasladados a la solución de vitrificación que contiene EG + DMSO y trehalosa en MEM + HPC a temperatura ambiente, hasta que el ovocito se encoja severamente y se sumerja en el medio de vitrificación.

Los ovocitos son luego cargados individualmente con una pipeta de vidrio en la parte superior de la pajilla con una cantidad mínima de medio del kit y la muestra es rápidamente sumergida en el nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por lo que la congelación es inmediata; posteriormente se cubre una tapa protectora. El tiempo entre la inmersión en la solución de vitrificación y la inmersión en el nitrógeno líquido es de 60 a 90 segundos.

## VENTAJAS E INCONVENIENTES

### Congelación lenta:

→ costosa crio máquina programada que usualmente toma horas para terminar un procedimiento y un costo muy elevado de mantenimiento.

→ es muy difícil eliminar el daño celular debido a la formación de cristales de hielo.

→ viabilidad post descongelación alrededor de 40 a 60%.

### Vitrificación:

→ tasa de implantación de los embriones procedentes de óvulos vitrificados es mayor que la de los embriones procedentes de óvulos congelados con el método lento.

→ el riesgo de cristalización y criofractura de los óvulos es menor.

→ tasa de supervivencia de los óvulos en torno al 90%.



	Congelación clásica	Vitrificación
Daño por formación de cristales internos	sí	no
Velocidad de congelación	0,3 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$	23.000 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$
Cantidad de crioprotector	baja	alta
Supervivencia celular	baja	alta
Procedimiento	sencillo	complejo

# CRIOPROTECTORES

Son sustancias químicas que protegen a las células del daño producido por la formación de cristales de hielo.

→ muy solubles en agua.

→ toxicidad dependiente de la concentración.

→ trabajan directamente en la membrana celular a través de interacciones electrostáticas, bajan el punto de congelación de la solución y modifican los entornos tanto intra como extracelulares porque el agua se sustituye en gran medida por el crioprotector, evitando la formación de cristales de hielo.

Hay dos clases principales:

Crioprotectores permeables:

Sustancias hidrófilas PM < 400 daltons.

Penetran en la membrana celular muy fácilmente, creando un gradiente osmótico y haciendo que el agua salga de la célula.

Dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, 1,2 propanodiol (PROH) y etilenglicol.

Crioprotectores no permeables:

Moléculas son grandes, con PM > 1.000 daltons.

No atraviesan la membrana celular. Aumentan la concentración de solutos extracelulares, generando de ese modo un gradiente osmótico que hace que el agua salga de la célula, lo que lleva a la deshidratación antes de la congelación.

Sacarosa, fructosa, glucosa, dextrosa, almidón, lipoproteínas y polivinilpirrolidona (PVP).



El glicerol:

Primer crioprotector más usado comúnmente para los espermatozoides.

→ tiene efectos tóxicos sobre los espermatozoides.

Durante los últimos años, se han introducido complejos crioprotectores para intentar mejorar la recuperación funcional de los espermatozoides después de la congelación.

Otros crioprotectores incluyen moléculas inertes, citrato, yema de huevo o leche, fructosa, TEST-citrato-buffer de yema, la yema – citrato – dextrosa – glicina, yema de huevo y citrato.



**¡Muchas gracias!**