

# Efecto de la hiperviscosidad seminal sobre la integridad acrosómica y la movilidad espermática antes y después de la criopreservación.

Ricardo Lozano-Hernández<sup>1,2</sup>, Javier Gualdrón<sup>2</sup>, Daniel Nava<sup>2</sup> y Mary Alejandra Rojas Lozano<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Cátedra de Fisiopatología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

<sup>2</sup>Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Ginecológicas “Dr. Giovanni Vivas Acevedo” (CEDIEG). Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

**Palabras clave:** criopreservación; integridad acrosómica; espermograma; glándulas accesorias; viscosidad seminal.

**Resumen.** La criopreservación del semen es una herramienta útil en la reproducción asistida, la cual puede tener impacto en las características espermáticas durante el congelamiento y el descongelamiento. El objetivo de este estudio fue valorar la integridad del acrosoma y la movilidad de los espermatozoides criopreservados y descongelados provenientes de muestras hiperviscosas y no viscosas. Se realizó el espermograma, la integridad del acrosoma, el espermocultivo y los niveles de los marcadores de glándulas accesorias en 60 muestras de semen. Cada alícuota de semen fue inmersa en un crioprotector comercial para congelar a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Transcurridos 30 días, éstas fueron descongeladas y en el sedimento celular espermático resuspendido se evaluó la movilidad y la integridad acrosómica, disminuyendo significativamente la movilidad progresiva ( $p<0,05$ ), la vitalidad espermática ( $p<0,005$ ) y la integridad acrosómica ( $p<0,05$ ); dicho descenso fue más evidente en las muestras hiperviscosas. La viscosidad del semen fresco se relacionó inversamente con la movilidad y la integridad del acrosoma antes y después del congelamiento ( $p<0,05$ ). En veinte muestras de semen se identificó la presencia de microorganismos y de anticuerpos IgA anti *C. trachomatis*, de las cuales quince muestras en la reproducción hiperviscosas. El aumento de la viscosidad seminal y los niveles de ácido cítrico están asociados con disfunción prostática, baja movilidad espermática y reacción prematura del acrosoma, lo que puede reducir la capacidad fecundante de un espermatozoide. La etiología de la hiperviscosidad sigue siendo compleja; sin embargo, para preservar la movilidad y la integridad del acrosoma, previamente deben investigarse sus causas en las muestras seminales que van a ser sometidas a la criopreservación.

Autor de correspondencia: Ricardo Lozano-Hernández, Cátedra de Fisiopatología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. Teléfono (0274) 2403410-5119119 . Coreo electrónico: ricardolozanoh@hotmail.com.

## Effect of seminal hyperviscosity on acrosomal integrity and sperm motility before and after cryopreservation.

*Invest Clin* 2016; 57(3): 267 - 279

**Key words:** cryopreservation; acrosome integrity; spermogram; male accessory glands; semen hyperviscosity.

**Abstract.** Semen cryopreservation is a useful tool in assisted reproduction, which may have impact on sperm characteristics during freezing and thawing. The aim of this study was to assess the integrity of the acrosome and motility of cryopreserved and thawed spermatozoos in hyperviscous and no viscous samples. In semen samples spermogram, glandular markers, acrosome integrity, culture and the levels markers accessory glands were measured. Each aliquot of semen was immersed in cryoprotectant and maintained in a commercial freezer at  $-196^{\circ}\text{C}$ . After 30 days, these were thawed and in the cell pellet resuspended, spermatoc motility and acrosomal integrity were evaluated. In thawed samples, there were significant decreases in progressive motility ( $p < 0.05$ ), vitality ( $p < 0.005$ ) and acrosome integrity ( $p < 0.05$ ) with respect to fresh sperm, this decline was most evident in hyperviscous samples. The viscosity of fresh semen was inversely related to motility and acrosome integrity before and after freezing ( $p < 0.05$ ). Twenty semen samples showed the presence of microorganisms and *C. trachomatis* IgA antibodies, of which fifteen showed hyperviscosity. Biochemical analysis demonstrated that semen samples with low levels of citric acid had less acrosomal integrity both before and after freezing ( $p < 0.05$ ). The viscoelasticity and citric acid levels are associated with prostate dysfunction, low sperm motility and premature acrosome reaction, which can reduce the fertilizing capacity of sperm. The etiology of hyperviscosity remains complex; however, to preserve motility and acrosome integrity, its causes must be investigated previously in the seminal samples to be subjected to cryopreservation.

*Recibido:* 11-10-2015. *Aceptado:* 02-06-2016

### INTRODUCCIÓN

Los estudios de la reproducción humana han aumentado notablemente con las técnicas de reproducción asistida como la inseminación intrauterina, fertilización *in vitro*, inyección intracitoplasmática del espermatozoide y criopreservación de muestras seminales, entre otras (1).

La criopreservación de espermatozoides se lleva a cabo mediante congelamiento de las muestras seminales con el empleo de nitróge-

no líquido hasta alcanzar una temperatura extrema de  $-149^{\circ}\text{C}$  tratando de mantener después del congelamiento su integridad fisiológica (2), en especial la movilidad espermática (3). Para preservar la integridad celular ante un cambio tan brusco de temperatura se requiere del uso de crioprotectores adecuados para minimizar la pérdida de agua dentro del espermatozoide y la formación de cristales intracelulares que dañarían las estructuras de la célula (4).

Cualquier muestra destinada para criopre-

servación, debe someterse a pruebas y controles de calidad seminal, entre ellas están la prueba de movilidad espermática, concentración espermática e integridad de estructuras fundamentales del espermatozoide como la cromatina, la membrana plasmática y el acrosoma (5), pero muy pocos estudios toman en cuenta el efecto de la hiperviscosidad seminal en la criopreservación.

La hiperviscosidad del semen (HVS) se ha asociado con reducción de la movilidad espermática que impide la progresión normal de los espermatozoides a través del tracto genital femenino. (6).

Del mismo modo, la HVS conduce a dificultades técnicas en el manejo de las muestras; por ejemplo, cuando se capacita la muestra de semen en la fertilización *in vitro* (FIV) (7). Un estudio demostró que las muestras seminales hiperviscosas tenían niveles de fructosa reducidos y se asociaban con disfunción de las vesículas seminales (8). La HSV se ha asociado con cambios en la secreción de proteínas del epidídimo, vesículas y de próstata, que generan aumento en la filancia, la cual se incrementa a medida que se extiende la inflamación en las glándulas accesorias (prostatitis <prostato-vesiculitis <prostato-vesículo-epididimitis) (9). En un estudio se evidenció que la presencia de algunos microorganismos en semen se asociaba con disfunción de las glándulas accesorias masculinas y descenso en sus marcadores bioquímicos glandulares. La medida de los marcadores fructosa, ácido cítrico y alfa- glucosidasa neutra de manera oportuna junto al diagnóstico microbiológico, permiten orientar más acerca de la propagación de la infección y la selección de la terapia más eficaz (10).

Uno de los aspectos más importantes del espermograma es la movilidad espermática, la cual depende del movimiento flagelar del espermatozoide y se ha correlacionado directamente con la fertilidad, lo que le permite avanzar progresivamente a través del cuello uterino y ampolla del oviducto para penetrar en el ovocito

y fecundarlo (11). La movilidad espermática se ha encontrado reducida en muestras con elevada viscosidad con reducción en los niveles de marcadores bioquímicos glandulares (12,13).

Por otra parte, la integridad del acrosoma espermático está asociada con la capacidad fecundante del mismo, y es indispensable para la reacción acrosómica que permite el ingreso del material genético del espermatozoide al interior del óvulo (14,15). Pocos estudios se han enfocado en el proceso de reacción del acrosoma del espermatozoide humano y su relación con las infecciones. Se ha reportado que las infecciones por *C. trachomatis* alteran la capacitación espermática y la reacción del acrosoma (16). También se ha demostrado que la presencia de microorganismos patógenos inducen la reacción prematura del acrosoma a través de un mecanismo dependiente de calcio (17).

Otros hallazgos afirman el hecho de que la criopreservación de los espermatozoides humanos disminuye la movilidad, la vitalidad y la integridad del acrosoma, entre otros (18). En virtud de lo expuesto se establecieron como objetivos comparar la integridad acrosómica y movilidad espermática antes y después de la criopreservación, así como comparar la integridad del acrosoma, la movilidad, los marcadores bioquímicos de glándulas accesorias y la presencia de microorganismos en muestras seminales con y sin hiperviscosidad.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo trasversal en 60 individuos subfértiles que acudieron al Centro de Infertilidad referidos de la consulta de infertilidad y de urología para la evaluación seminal. Las características seminales se evaluaron de acuerdo al 5° Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (19). Los pacientes firmaron el consentimiento siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki para investigación en humanos re-

señados en el código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT (20). Como criterios de exclusión se consideraron muestras con oligozoospermia severa, azoospermia, hemospermia, criptozoospermia, hipospermia, necrozoospermia y astenozoospermia severa.

Antes del congelamiento cada muestra fue evaluada de la siguiente manera:

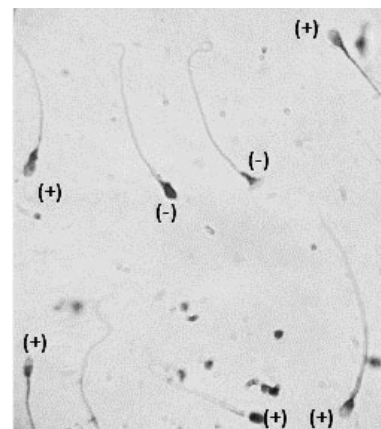
**Espermograma:** A) análisis macroscópico (licuefacción, aspecto, volumen y pH) (19). La viscosidad se evaluó semicuantitativamente una hora después de la eyaculación mediante el aspirado suave del semen en una pipeta Pasteur, midiéndose la filancia del semen al gotear, asignando el valor de 0 cuando era nula o menor a 2 cm; 1: leve (longitud de hilo  $> 2$  cm y  $\leq 4$  cm), 2 moderada ( $> 4$  cm y  $\leq 6$  cm) y 3 severa ( $> 6$  cm) (21). B) Análisis microscópico (movilidad, concentración y vitalidad espermática) (19).

**Evaluación microbiológica del semen libre de plasma seminal para el descarte de cocos y bacilos aeróbicos y microaerófilos facultativos:** A) siembra en placas de agar para el descarte de Enterobacterias, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus sp* y *Staphylococcus sp*. B) Cultivos en pozos de Mycoplasmas *M. hominis* y *U. urealyticum*: El semen fue diluido 1:10 en solución salina fisiológica estéril y sembrado en pozos con medio enriquecido A7 (Mycoplasma System Plus, Diagnostici Liofilchem).

**Determinación de anticuerpos (Acs) anti Chlamydia:** anticuerpos locales IgA con un estuche comercial (Sero ELISA; Savyon, Beer-Sheva, Israel) (22).

**Análisis bioquímico de marcadores glandulares:** fructosa, fructosa corregida verdadera, 1,4  $\alpha$ -glucosidasa neutra y ácido cítrico (23).

**Integridad acrosómica:** se determinó usando el colorante comercial Sperm stain™-Fertipro nv, en un fino frotis con semen sin diluir, considerándose positivos aquellos que mantenían el acrosoma íntegro y negativos aquellos que no presentaban membrana acrosomal externa porque habían tenido reacción prematura del acrosoma (Fig. 1). El recuento celular se llevó a cabo, por duplicado, en 200 células en cada paciente (24).



**Fig. 1.** Coloración Sperm stain, acrosoma íntegro (+), sin acrosoma o acrosoma reaccionado (-).

Para la congelación del semen se utilizó un crioprotector comercial Quinn's Advantage® Sperm Freeze, siguiendo las instrucciones del fabricante (25). La descongelación de los viales se realizó a los 30 días, en un baño de María a una temperatura de 30 a 35 °C. Se mezcló 1:1 semen descongelado con buffer PBS pH 7,2; las mezclas se centrifugaron a 800 rpm. durante 7 minutos, y del sobrenadante se extrajo el crioprotector quedando el sedimento en el fondo, el cual fue resuspendido hasta 1 mL con el buffer. Se les realizó el análisis microscópico (concentración, movilidad y recuperación de espermatozoides móviles: REM) (26) y se realizó un frotis de la suspensión de espermatozoides fijar, colorear y cuantificar la integridad acrosómica.

### Estadística

Se utilizó el sistema estadístico IBM SPSS Statistics 21 con una significancia estadística de 0,05; se realizó análisis de varianza ANOVA, t de Student y coeficiente de Pearson para correlacionar diversas variables aleatorias cuantitativas.

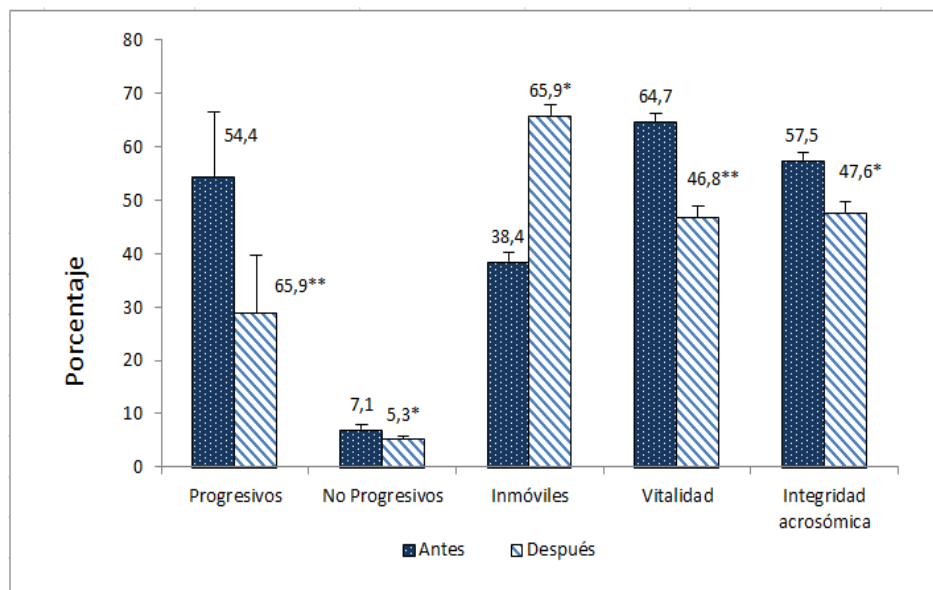
### RESULTADOS

Después del proceso congelamiento-descongelamiento de las muestras sometidas a criopreservación se observó una disminución significativa de la movilidad espermática en las siguientes categorías: Progresivos PR: ( $54,4 \pm 15,4$  a  $28,9 \pm 14,9$ ;  $p \leq 0,05$ ); No-progresivos NP: ( $7,1 \pm 3,9$  a  $5,2 \pm 3,1$ ;  $p \leq 0,05$ ); Vitalidad: ( $73,6 \pm 11,1$  a  $46,8 \pm 11,1$ ;  $p \leq 0,05$ ), e Integridad del acrosoma: ( $57,4,6 \pm 17,5$  a  $47,6 \pm 15,9$ ;  $p \leq 0,005$ ). Estos resultados reflejaron, simultáneamente, un aumento de los espermatozoides inmóviles (IM). (Fig. 2).

Con respecto a la frecuencia de la HVS de las 60 muestras analizadas, 22 de estas (36,6%) mostraron hiperviscosidad HVS(+), mientras que 38 muestras (63,4%) tenían viscosidad nula HVS(-). En 22 muestras con HVS(+) se identificaron microorganismos en 15 casos, siendo *C. trachomatis* y *U. urealyticum* los gérmenes más frecuentes; en las 38 con HVS(-) se identificaron microorganismos en 5 casos, siendo más frecuente la presencia de *Staphylococcus* sp (Tabla I).

En la Fig. 3 se muestran los valores promedio de movilidad (progresiva y no progresiva) y la vitalidad en los grupos HVS(+) y HVS(-) entre los cuales no se observaron diferencias; no obstante, al evaluarse la integridad del acrosoma (Spermac stain) se encontró que en las muestras HVS(+) fue más baja que en las muestras HVS(-) ( $p \leq 0,005$ ).

Al analizar la concentración espermática/mL y la concentración de espermatozoides progresivos/mL, no se encontraron diferencias en-



**Fig. 2.** Características espermáticas móviles progresivos y no progresivos, vitalidad e integridad acrosómica antes y después de la criopreservación. Comparación antes vs. después del descongelamiento de las características espermáticas en porcentaje de movilidad progresiva, movilidad no progresiva, inmóviles, vitalidad e integridad del acrosoma \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ .

**TABLA I**  
**FRECUENCIA DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS Y ANTICUERPOS**  
**ANTI-CHLAMYDIA IDENTIFICADOS EN LAS MUESTRAS**  
**SIN VISCOSIDAD Y CON VISCOSIDAD**

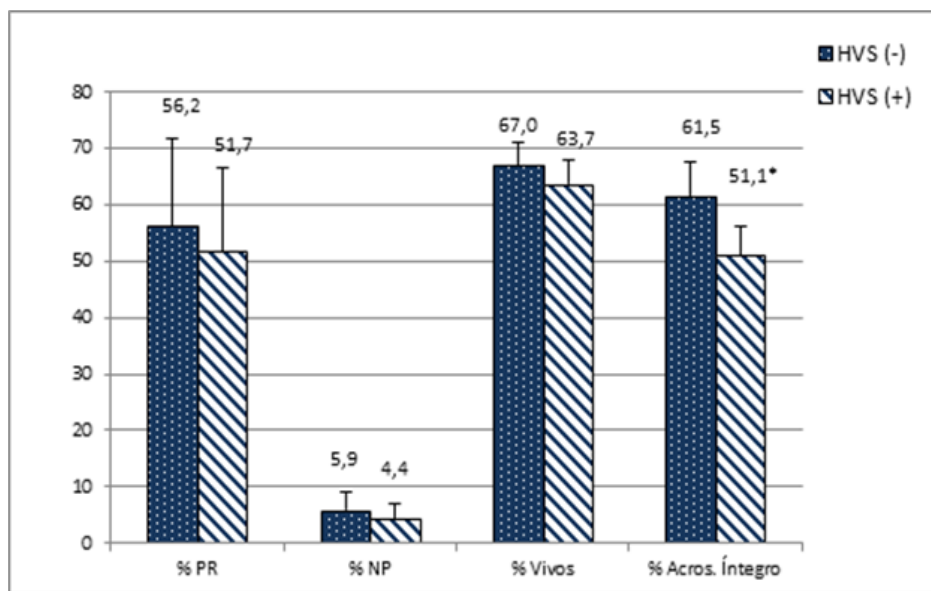
Muestras	HVS (-)		HVS (+)		Grado de HVS		
	(n)	(%)	(n)	(%)	Leve (n)	Moderada (n)	Severa (n)
<i>C. trachomatis</i>	1	1,7	4	15,4	1	1	2
<i>U. urealyticum</i>	0	0,0	4	6,7	0	1	3
<i>M. hominis</i>	0	0,0	1	1,7	0	1	0
<i>Staphylococcus</i> sp	2	3,3	1	1,7	0	1	0
<i>Streptococcus</i> sp	1	1,7	2	3,3	0	0	2
<i>E. coli</i>	1	1,7	0	0,0	0	0	0
<i>Klebsiella</i> sp	0	0,0	1	1,7	1	0	0
<i>Enterobacter</i> sp	0	0,0	1	1,7	1	0	0
<i>N. gonorrhoeae</i>	0	0,0	0	0,0	0	0	0
≥ 2 gérmenes	0	0,0	1	1,7	1	0	0
Positivos	5	8,3	15	33,7	4	4	7
Negativos	33	91,7	7	66,3	3	0	3
Totales	38	100	22	100	7	4	10

Resultado de los gérmenes cultivados y los anticuerpos anti-*C. trachomatis* detectados en muestras sin hiperviscosidad [HVS (-)] y con hiperviscosidad [HVS(+)]. En el grupo de muestras HSV (+) se señala la frecuencia de muestras los grados leve:1, moderada: 2 y severa:3 de HVC en relación en cada germen identificado.

tre los grupos HVS(+) y HVS(-). Al congelarse y descongelarse las muestras de semen, en el sedimento libre de criopreservante se determinó la recuperación de espermatozoides móviles, siendo significativamente menor en las muestras HVS(+) con respecto a las HVS(-) ( $p \leq 0,005$ ).

Al comparar los marcadores bioquímicos glandulares en los grupos con y sin hiperviscosidad, no se observaron diferencias entre los grupos con respecto a los marcadores de vesículas seminales (fructosa y FCV) ni en las de epidídimo El ácido cítrico (marcador de próstata) fue el único marcador glandular que se encontró significativamente inferior en las muestras con HVS ( $p \leq 0,002$ ) (Tabla II).

Se midieron en los grupos HSV(+) y HSV (-) el número de espermatozoides/mL ( $118,0 \pm 64,8$  vs.  $108,1 \pm 60,1$ ), la concentración de células redondas/mL ( $2,90 \pm 2,8$  vs.  $2,2 \pm 1,4$ ) y la concentración de leucocitos/mL ( $1,33 \pm 1,30$  vs.  $0,96 \pm 0,72$ ) sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Se observó aumento de los leucocitos en las muestras HVS(+), pero el valor de sus desviaciones estándares redujeron su diferencia estadística; sin embargo, al asociarse por separado la integridad del acrosoma con los parámetros del espermograma (concentración/mL, células redondas/mL y leucocitos/mL), se encontró que la integridad del acrosoma guardaba relación directa con la



**Fig. 3.** Características espermáticas movilidad, vitalidad e integridad acrosómica en muestras sin hiperviscosidad y con hiperviscosidad. Comparación de características espermáticas entre muestras sin hiperviscosidad HVS(-) y con hiperviscosidad HVS(+). Valores porcentuales: % PR: espermatozoides progresivos; %NP: espermatozoides no progresivos; y acrosomas íntegros: Test de integridad del acrosoma. \* $p \leq 0,05$ .

concentración de espermatozoides/mL, mientras que la viscosidad mantenía una relación inversa con los acrosomas, íntegros tanto antes como después del congelamiento (Tabla III).

En cuanto a los marcadores de las glándulas accesorias y su relación con la integridad acrosómica, se encontró que el marcador bioquímico de vesículas seminales, fructosa, no guardó relación con la integridad del acrosoma en semen recién eyaculado ni después de ser descongelado; los niveles de ácido cítrico (marcador de próstata) si mostraron relación significativa con la integridad del acrosoma en espermatozoides frescos y descongelados. Con respecto a la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa neutra, ésta no guardó relación con la integridad acrosómica antes ni después del proceso de criopreservación (Tabla IV).

## DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron las características seminales que reducen la recuperación espermática en los procesos de congelamiento y descongelamiento seminal. Al descongelarse las muestras de semen se observó reducción significativa del porcentaje de espermatozoides progresivos (PR), no-progresivos (NP) y viables en todas las muestras; dichos resultados concuerdan con otros estudios que reportan el impacto de la baja temperatura sobre la calidad del semen humano (18). Cabe destacar que la membrana mitocondrial involucrada en el sistema motriz del flagelo espermático se ve afectada por la refrigeración (27,28).

La bacteriospermia tanto por microorganismos saprofitos como patógenos es más frecuente en las muestras hiperviscosas. Aunque

**TABLA II**  
**MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LAS GLÁNDULAS**  
**ACCESORIAS MASCULINAS**

Marcador	Unidades	HVS (-)	Con HVS (+)
Fructosa	μmol/eyaculado	69,1 ± 8,4	68,03 ± 6,4
FCV	mg/mill espz/mL	5,28 ± 0,3	6,09 ± 0,4
AGN	UI/eyaculado	25,52 ± 3,2	24,01 ± 2,4
Ac. Cítrico	mg/dL	512,9 ± 38,9	498,1 ± 42,9*

FCV: fructosa corregida verdadera expresada en mg / millones de espermatozoides móviles/mL. AGN: alfa-glucosidasa neutra \* p ≤ 0,05.

**TABLA III**  
**CORRELACIÓN DE PEARSON DE INTEGRIDAD ACROSÓMICA ANTES Y**  
**DESPUÉS DE LA CRIOPRESERVACIÓN CON LOS PARÁMETROS DEL**  
**ESPERMOGRAMA**

Parámetros seminales en semen fresco	Integridad acrosómica en fresco	Integridad acrosómica en espermatozoides descongelados
Viscosidad	-0,29*	-0,25*
Espermatozoides/mL	0,16	0,25
Células redondas/mL	0,13	-0,06
Leucocitos/mL	0,09	-0,07

Correlación de las características del Espermograma viscosidad, Espermatozoides/mL, Células redondas/mL y Leucocitos/mL con respecto a los acrosomas íntegros en semen recién eyaculado y en espermatozoides después del descongelamiento, lavados y resuspendidos. \* p ≤ 0,05.

el screening infeccioso ha sido ampliamente sugerido en los bancos de semen para el descarte de los microorganismos más comunes de infecciones de transmisión sexual, tales como: *Treponema pallidum* y los virus de inmunodeficiencia humana y hepatitis (B y C), la detección de otros patógenos bacterianos en semen

es subestimada, pudiendo estar presentes otros microorganismos saprofitos y patógenos en los procesos de criopreservación seminal (29), especialmente en las muestras hiperviscosas, las cuales pueden estar infectadas por bacterias patógenas. Se ha demostrado que la viscosidad seminal a menudo se asocia con infección pros-



**TABLA IV**  
CORRELACIÓN DE PEARSON DE INTEGRIDAD ACROSÓMICA ANTES Y DESPUÉS DE LA CRIOPRESERVACIÓN CON LOS MARCADORES DE GLÁNDULAS ACCESORIAS MASCULINAS

Marcador	Integridad acrosómica en fresco	Integridad acrosómica en espermatozoides descongelados
Fructosa $\mu\text{mol/eyaculado}$	-0,06	-0,06
AGN UI/eyaculado	0,08	0,13
Ácido cítrico mg/dL	0,55*	0,22*

Correlación de la integridad del acrosoma en semen recién eyaculado y en espermatozoides después del descongelamiento con respecto a los marcadores de vesículas seminales (Fructosa); de epidídimo  $\alpha$ -glucosidasa neutra (AGN) y de próstata (ácido cítrico) \*  $p \leq 0,05$

tática por *Chlamydia trachomatis* la cual reduce la movilidad espermática aunque no se alteran los demás parámetros del espermograma; tales cambios logran ser revertidos si son tratados adecuadamente con antibióticos (30). El manejo terapéutico de la HVS con el uso de antibióticos ha mostrado resultados favorable en el la mayoría de los casos al erradicar la infección. Por lo general la HVS asociada a prostatitis crónica puede revertirse, aumentando además la movilidad espermática y descendiendo la concentración de leucocitos y de citocinas proinflamatorias. Cerca de un tercio de los casos de HVS que no responden al tratamiento pueden tener concentraciones bacterianas muy elevadas o con compromiso de otras glándulas que no mejoran la movilidad espermática con la antibióticoterapia (21,31).

El congelamiento y descongelamiento puede activar el proceso de reacción acrosómica, lo que ayuda a explicar uno de los mecanismos que disminuyen la capacidad fecundante del espermatozoide por reacción prematura, tal como ha sido descrito en otros estudios (32,33). Esto podría ser explicado por una desestabilización a nivel de la membrana, producto del congelamiento, que afecta la composición lipídica

de la bicapa, lo cual causaría que el calcio se encuentre más permeable y, por tanto, entraría al espermatozoide iniciando la capacitación y, en consecuencia, la reacción acrosómica (18,34). El aumento de la reacción acrosómica es sinónimo de baja tasa de fertilidad, ya sea pre o post descongelado. Dado que el acrosoma contiene las enzimas necesarias para que el espermatozoide pueda penetrar y fertilizar el ovocito, a menor daño acrosomal durante la criopreservación, mayor sería la tasa de fertilidad resultante (35).

Se ha demostrado que la presencia de ciertos gérmenes en semen pueden alterar los marcadores glandulares. La evaluación microbiológica y bioquímica del semen podría orientar más acerca de la propagación de la infección y permitir la selección de la terapia más eficaz (10). En el presente estudio se encontró una relación directa entre concentraciones normales de citrato e integridad acrosómica post descongelamiento. El ácido cítrico es un marcador prostático, el cual es regulado por la testosterona y su descenso puede asociarse con infección (36,37).

Los resultados obtenidos indican una relación directa entre la concentración de ácido cítrico en el plasma seminal y la integridad acro-

sómica en las muestras descongeladas, esto se debe a que en el momento de la criopreservación los espermatozoides se vuelven más permeables al calcio iónico, el cual es el principal inductor de la reacción acrosómica (15,33); si la muestra posee niveles elevados de ácido cítrico, aumenta la captura del calcio iónico y disminuye la inducción de la reacción acrosómica. El ácido cítrico es uno de los aniones más importantes; tiene alta afinidad por el calcio iónico, el magnesio y el zinc de allí su descenso tendría menor efecto contrarregulador en la reacción acrosómica prematura (38,39).

Se ha demostrado un aumento de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 y EROS en muestras hiperviscosas, sobre todo cuando se inflama más de una glándula como es el caso de la prostatitis-vesiculitis; así, cuando la inflamación se extiende hacia las vesículas seminales aumenta la viscosidad y la producción de EROS (40). También se ha demostrado que la hiperviscosidad es una causa de infertilidad de tipo post testicular que afecta la movilidad y probablemente la reacción del acrosoma, aunque no se ha demostrado su relación con cromatina espermática (41).

Se encontró que la movilidad era más baja en las muestras hiperviscosas, estos resultados fueron similares a los encontrados por Layali y col. (42) quienes encontraron, además de la movilidad, un descenso significativo en las formas normales y de la concentración espermática con un aumento de la peroxidación lipídica.

A menudo, se ha observado HVS en el semen de hombres subfértiles, en los que su movilidad es reducida por un "efecto de captura"; por otra parte, se ha relacionado la HVS seminal con infecciones del tracto genital masculino, mayormente entre HVS por *Ureaplasma urealyticum*; así como también se ha encontrado relación con inflamaciones del tracto genital masculino. A pesar de estas relaciones se ha llegado a la conclu-

sión de que la HVS no se debe solo a un factor etiopatogénico, sino más bien a varios factores (bioquímicos, microbiológicos, obstructivos, enzimáticos y genéticos) que actúan en sinergia para aumentarla (21); conociendo esto es de esperarse que una muestra con HVS, conjuntamente con baja calidad seminal, sea un factor predisponente para que las muestras tengan un bajo porcentaje de integridad acrosómica.

En este estudio se demuestra una relación inversa entre la viscosidad seminal e integridad acrosómica y movilidad en las muestras pre congeladas; es decir, a mayor viscosidad menor integridad acrosómica y menor cantidad de espermatozoides progresivos, por lo tanto se puede considerar el efecto deletéreo de la viscosidad seminal sobre la calidad del semen, la fisiología espermática y posiblemente sobre su capacidad fecundante; de manera que las muestras con viscosidad elevada cualquiera sea su causa deben considerarse inapropiadas para la criopreservación y las demás técnicas de reproducción asistida.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Dra. Judith Velasco por los análisis microbiológicos, a la Licenciada Carmen Lozano por su aporte en la detección de Anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis*, al Asistente Héctor Picón por su trabajo Técnico y a la secretaria Marilú Albarrán por el manejo de la información.

## REFERENCIAS

1. **Sunderam S, Kissin D, Crawford S, Folger S, Jamieson D, Warner L, Barfield W.** Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2012. MMWR Surveill Summ 2015;64:1-29.
2. **Ávila L, Madero I, López C, León M,**

- Acosta L, Gómez C, Delgado L, Gómez C, Lozano J, Reguero M.** Fundamentos de criopreservación. *Rev Col Obst Ginec* 2006; 57: 291-300.
3. **Omes C, Marchetti AL, Masanti ML, Bassani R, Tinelli C, Sanarica RC, Spinillo A, Nappi RE.** Human spermatozoa cryopreservation: comparison of three different freezing protocols. *Cryo Lett* 2013;34:535-543.
  4. **Pegg DE.** The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 2002; 20:5-13.
  5. **Matás, C, García-Vázquez F, Sansegundo M, Gadea J, Coy P, Ruiz, S.** Estudio de la capacitación espermática in vitro en espermatozoides eyaculados y epididimarios ITEA 2007;28:30-32.
  6. **Elia J, Delfino M, Imbrogno N, Capogreco F, Lucarelli M, Tiziana R. y Mazzilli F.** Human semen hyperviscosity: prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects *Asian J Androl* 2009; 609-615.
  7. **Esfandiari N, Burjaq H, Gotlieb L, Casper RF.** Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a prospective study. *Fertil Steril* 2008; 90: 1739-1743.
  8. **Andrade-Rocha F.** Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1203-1210.
  9. **La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Aagata R, Salemi M, Calogero A.** Hyperviscosity of semen in patients with male accessory gland infection: direct measurement with quantitative viscosimeter. *Andrology* 2012; 44:556-559.
  10. **Lozano-Hernández R, Vivas-Acevedo G, Muñoz de Vera MG.** Mycoplasmas and antibodies anti-Chlamydia in semen of infertile men and their relationship with seminal quality and markers of male accessory sex glands. *Invest Clin* 2012;53:138-147.
  11. **Bajo Arenas J, Corolue Lletgel B.** Fundamentos de reproducción. 2a Ed. España: Médica Panamericana; 2009, p 409.
  12. **Carpino A, Siciliano L.** Unaltered protein pattern/genital tract secretion marker levels in seminal plasma of highly viscous human ejaculates. *Arch Androl* 1998; 41: 31-35.
  13. **Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi Segovia LM, Repetto HE, Blanco AM.** Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl* 2003;49:343-349.
  14. **Del Rio M, Godoy A, Toro A, Orellana R, Cortes M, Moreno M, Vigil P.** La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Rev Int Androl* 2007; 5:368-373.
  15. **Arenas-Ríos E, Cambrón A, Ambríz D, Zuñiga P, Rodríguez A. y Rosado A.** Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contacto S* 2010;78:5-11.
  16. **Jungwirth A, Straberger A, Esterbauer B, Fink K, Schmeller N.** Acrosome reaction in Chlamydia-positive and negative patients. *Andrology* 2003;35:314-316.
  17. **Rennemeier C, Frambach T, Hennicke F, Dietl J, Staib P.** Quorum-sensing molecules induce acrosome loss and cell death in human spermatozoa. *Infect Immun* 2009; 77: 4990-4997.
  18. **Manosalva I, Cortes C, Leyva V, Valdivia M, De los Reyes M, Barrios C. y Moreno R.** Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev Inv Vet* 2005;16,(2):114-128.
  19. **World Health Organization WHO laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.** 5th edition WHO press; 2010.
  20. **Briceño E, Suárez E, Michelangi C, Feli-**

- ciangeli D, Ptaiza E, Mendible J.** Código de Bioética y Bioseguridad 2002. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). 2ª edición. Venezuela.
21. **Tjioe DY, Oentoeng S.** The viscosity of human semen and the percentage of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 1968; 19: 562-565.
  22. **Lozano-Hernández R, Vivas-Acevedo G.** Impacto del tratamiento con antibiótico sobre la calidad seminal y los marcadores químicos de glándulas accesorias sexuales masculinas en presencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Fac Farm* 2011;53:13-21.
  23. **Lozano-Hernández R, Vivas-Acevedo G.** Análisis bioquímico del plasma seminal. En Cerezo G, Castilla J, Rodríguez H. Manual básico del semen. México: Ed Prado; 2013: p81-97.
  24. **Satoh K, Satoh S, Maehara I, Orikasa S.** Studies on human spermatozoal acrosome using spermac stain in fertile and infertile men including two cases of round-headed spermatozoa. *Ni Hin Gak Zas* 1989;80:562-568.
  25. **Quinn's Advantage® Sperm Freeze Disponible en:** [http://www.origio.com/documents/w0cnmi-5646\\_3.pdf](http://www.origio.com/documents/w0cnmi-5646_3.pdf).
  26. **Lozano-Hernández R, Saldivia M, Villavicencio A.** Concentración espermática mínima requerida para inseminación intrauterina mediante capacitación por swim-up. *Rev Ven Ginecol* 2014; 74:177-183.
  27. **Reardon A, Elliott J, McGann L.** Investigating membrane and mitochondrial cryobiological responses of HUVEC using interrupted cooling protocols. *Cryobiology* 2015;71:306-317.
  28. **Thomson L, Fleming S, Aitken R, De luliis G, Zieschang J. y Clark A.** Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reprod* 2009;24: 2061-2070.
  29. **Levy R, Grattard F, Maubon I, Ros A, Pozzetto B.** Bacterial risk and sperm cryopreservation. *Andrology* 2004;36:282-285.
  30. **Vicari L, Castiglione, Salemi, Vicari B, Mazzarino M, Vicari E.** Effect of levofloxacin treatment on semen hyperviscosity in chronic bacterial prostatitis patients. *Andrology* 2016; 48: 380-388.
  31. **La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Aagata R, Salemi M, Calogero AE.** Hyperviscosity of semen in patients with male accessory gland infection: direct measurement with quantitative viscosimeter. *Andrology* 2012; 44: 556-559.
  32. **Esteves S, Spaine D. y Cedenho A.** Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Braz J Med Biol.* 2007;40:985-992.
  33. **Fernández S, Sestelo A, Rivolta M, Cordoba M.** Capacitation and acrosome reaction induction on thawed dama deer spermatozoa: glycine effect as cryopreservation diluent supplement. *Zoolog Sci* 2013;30: 1110-1116.
  34. **Barrientos-Morales M, Mosqueda M, Trujillo M. y Montiel F.** Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca perinuclear en semen criopreservado de verraco. *Zootec Trop* 2009; 27:17-24.
  35. **Wiser A, Sachar S, Ghetler Y, Shulman A, Breitbart H.** Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: preliminary results. *Andrology* 2014;46:313-315.
  36. **Marconi M, Pilatz A, Wagenlehner F,**

- Diemer T, Weidner W.** Impact of infection on the secretory capacity of the male accessory glands. *Int Braz J Urol* 2009;.35:299-308.
- 37. Jungwirth Abdelmula A, Al-Fadhil O. y Badruldeen A.** Biochemical markers in semen and their correlation with fertility hormones and semen quality among Sudanese infertile patients. *Afric J Biochem* 2010;4: 255-260.
- 38. Ford W, Harrison A.** The role of citrate in determining the activity of calcium ions in human semen. *Int J Androl* 1984;7:198-202.
- 39. Comhaire FH, Mahmoud A, Depuydt CE, Zalata A, Christophe A.** Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999;5:393-398.
- 40. Castiglione R, Salemi M, Vicari L, Vicari E.** Relationship of semen hyperviscosity with IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 and ROS production in seminal plasma of infertile patients with prostatitis and prostatic-vesiculitis. *Andrology* 2014;46:1148-1155.
- 41. Esfandiari N, de Lamirande E, Gukturk A, San Gabriel MC, Nazemian Z, Burjaq H, Casper RF, Zini A.** Seminal hyperviscosity is not associated with semenogelin degradation or sperm deoxyribonucleic acid damage: a prospective study of infertile couples. *Fertil Steril* 2014;101:1599-1603.
- 42. Layali I, Tahmasbpour E, Joulaei M, Jorsaraei SG, Farzanegi P.** Total antioxidant capacity and lipid peroxidation in semen of patient with hyperviscosity. *Cell J* 2015;16:554-559. Epub 2015.