



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Efectos de los antioxidantes en la preservación espermática tras proceso de congelación

Alumna: Gema Dolores García Delgado

Junio 2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGÍA

Trabajo Fin de Grado

Efectos de los antioxidantes en la preservación espermática tras proceso de congelación

Alumna: Gema Dolores García Delgado

Jaén, Junio 2015

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT	3
Palabras clave	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Reproducción asistida	4
1.2. Crioconservación	6
1.3. Sistema redox.....	7
1.4. Seminograma	8
1.5. Citómetro de flujo.....	9
1.6. Antecedentes.....	10
1.7. Justificación y objetivos	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1 Extracción del semen	13
2.2 Análisis del semen.....	13
2.3 Conservación de las muestras por congelación	16
2.4 Estudios citométricos.....	17
2.5 Análisis estadístico	19
3. RESULTADOS	19
3.1 Análisis seminal	19
3.2 Estudio de la producción de ERO.....	21
3.3 Estudio del estado de la condensación de la cromatina	24
3.4 Estudio del estado de la membrana lipídica	28
4. DISCUSIÓN	31
5. BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO I: Autorización comité bioética.....	37

RESUMEN

Debido a la elevada tasa de infertilidad que existe en humanos, se han desarrollado técnicas para mejorar su fecundidad que requieren de procesos de conservación espermática. Se han desarrollado métodos de conservación como la congelación. Sin embargo, estudios previos demostraron que la crioconservación causa daño celular, por ello en este estudio se analizó los efectos que tiene la adición de tres antioxidantes sobre la crioconservación tras un previo análisis seminal pre y postcongelación, el glutathion oxidado (GSSG), el glutathion reducido (GSH) y el ácido docosahexaenoico (DHA), añadidos antes de la congelación. Se analizaron tres parámetros: i) producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), ii) la condensación de la cromatina y iii) el estado de la membrana lipídica. Se pudo observar el efecto de mayor protección en DHA con respecto al resto. Podemos asumir que para mejorar la supervivencia del semen en congelación es necesaria la adición de antioxidantes como DHA.

Palabras clave: ERO, antioxidantes, crioconservación, semen.

ABSTRACT

Nowadays there is a high level of infertility in the human population so some techniques have been developed to enhance the human fertility. These techniques require methods of spermatic conservation. News methods have been developed to preserve the cells as can be by freeze-thaw method. Previous studies have shown that cryoconservation can damage cells, therefore in this study we have analyzed the effects that the addiction of three antioxidants have onto cryopreservation. These antioxidants are oxidative glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH) and docosahexaenoic acid (DHA), added before freezing. Then we have analyzed three parameters: i) the reactive oxygen species (ROS) production, ii) the state of chromatin condensation and iii) the state of lipid membrane. We can observe that the effect of protection was greater with DHA than with the others. We can assume that the addition of antioxidants as DHA is necessary to improve the sperm survival.

Key words: ROS, antioxidants, cryopreservation, sperm.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Reproducción asistida

Con el avance en la tecnología, hoy en día también se ha avanzado en las técnicas que ayudan a la reproducción asistida, permitiendo a parejas que de forma natural no son capaces de concebir, es decir, que son infértiles, mediante la reproducción asistida puedan conseguirlo.

1.1.1. Historia.

La reproducción asistida comenzó por el año 1784, donde un médico y sacerdote italiano, Lázaro Spallanzani (1729-1799), llevó a cabo la primera inseminación artificial en mamíferos de forma exitosa. Un año más tarde sería el cirujano escocés John Hunter (1728-1793) quien llevase a cabo los primeros intentos de inseminación en humanos en 1785, en el que en ese mismo año nació un bebé sano. Durante los dos siglos siguientes, el siglo XIX y XX, se produjo un grandísimo avance en los conocimientos sobre la reproducción humana, donde además surgió la “Endocrinología” lo cual ayudó bastante en el avance en la reproducción asistida. Y ya por el año 1978, concretamente el 27 de enero de ese mismo año, nace la primera niña resultado de una fecundación in vitro y reimplantación embrionaria (*Mendiola et al., 2005*). De tal forma que a día de hoy se han desarrollado fundamentalmente tres técnicas de reproducción asistida: la inseminación artificial (por donación de ovocitos o semen ya sean del paciente o de donantes), la fecundación in vitro (FIV) y fecundación in vitro empleando una Inyección Intracitoplasmática (ICSI).

1.1.2. Infertilidad.

Se considera por tanto infertilidad según el *Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine* como “Aquella pareja que no ha conseguido concebir después de más de 12 meses de mantener relaciones sexuales sin protección”. La infertilidad se ha visto que puede ocurrir ya sea por factores masculinos, como por factores femeninos, por ambos e incluso por factores desconocidos, destacando aquellos causados por factores masculinos con un 33% de los casos frente a los causados por factores femeninos con un 21% de los casos (*Louis et al., 2013* y *Thonneau et al., 1991*).

Existe una gran cantidad de factores que afectan al semen causando infertilidad masculina, y entre ellos destacan la disfunción eyaculatoria que puede ser causada por problemas medulares o la infección ya que a causa de ellos aumentan los niveles de leucocitos en el semen los cuales llevan asociados la producción de las especies reactiva del oxígeno (ERO), que son sustancias que se han visto que están relacionadas con las complicaciones que pueden aparecer en una concepción de forma natural o incluso mediante la fertilización in vitro (*Hernández-Matos et al., 2010*). También causa infertilidad masculina las causas sistémicas e iatrogénicas por exposición a altas temperaturas o radiación, y el varicocele por un mal flujo de la sangre a causa de las válvulas de las venas dentro del escroto.

1.1.3. Técnicas en Reproducción Asistida.

Las técnicas principales empleadas en Reproducción Asistida son la Fecundación in vitro (FIV), la Inseminación Artificial o la técnica de FIV utilizando una Inyección Intracitoplasmática (ICSI, Intra-cytoplasmatic Sperm Injection).

En la técnica FIV, mediante control hormonal, se obtienen de los ovarios maternos uno o varios óvulos maduros y listos para ser fecundados por espermatozoides en medios de suspensión donde se mantendrán in vivo a los óvulos y los espermatozoides. Una vez asegurado de que el óvulo queda fecundado, se vuelve a implantar al útero materno para que continúe el desarrollo del embrión.

La técnica de FIV se complementó con la inyección del espermatozoide directamente en el citoplasma del óvulo, surgiendo la técnica ICSI, para solventar la infertilidad masculina, ya que la técnica de FIV solventa solamente la infertilidad femenina debido a problemas en las trompas de Falopio principalmente. Y para ser más precisos aún, se desarrolló la técnica de IMSI (Intra-cytoplasmatic Morphologically-selected Sperm Injection) que permite seleccionar de forma exacta qué espermatozoide va a ser el elegido para fecundar el óvulo, y todo ello gracias al poder de resolución que tienen la técnica para poder visualizar los defectos de los espermatozoides y desecharlos eligiendo aquellos con mejor morfología (*Mauri et al., 2010* y *Wilding et al., 2011*).

La inseminación artificial consiste en implantar en el sistema reproductor femenino los espermatozoides ya sea del cónyuge de la paciente (IAC, Inseminación Artificial con semen del Cónyuge) o de un donante (IAD, Inseminación Artificial con

semen de un Donante) para parejas infértiles, generalmente infertilidad masculina, o en el caso de parejas del mismo sexo, las cuales tienen que recurrir a un banco de semen.

Como derivación de estas tres técnicas principales se desarrolló la técnica MACS (Magnetic Activated Cell Sorting), es una técnica que al igual que la IMSI, permite seleccionar el espermatozoide que será fecundado, pero en este caso se selecciona inmunomagnéticamente los espermatozoides sanos y óptimos para la fecundación, discriminando aquellos que poseen marcadores apoptóticos y están destinados a morir (*Said et al., 2008*).

1.2. Crioconservación

Para llevar a cabo las técnicas descritas anteriormente, se ha visto necesario conservar las muestras desde el momento de su obtención hasta su uso, por ello se han desarrollado las técnicas de conservación por congelación, la crioconservación.

La crioconservación es un proceso por el cual se mantiene la vitalidad y la funcionalidad celular a temperaturas muy bajas empleándose N líquido, de tal forma que se enlentecen las funciones biológicas, que en definitiva son reacciones bioquímicas, ralentizando el tiempo biológico. Sin embargo, estudios previos corroboran la existencia de daños colaterales por la congelación de la muestra, principalmente a nivel de membrana plasmática y a nivel de los orgánulos citoplasmáticos de las muestras celulares, debido a la aparición de cristales en el tejido celular por el proceso de congelación-descongelación (*Woods et al., 2004*). Cambios a nivel de estructura y composición de la membrana van a ser los indicativos del daño celular producido por la crioconservación determinando el índice de supervivencia de la muestra congelada (*Ávila-Portillo et al., 2006*).

Para revertir en cierto grado estos efectos de la congelación, se les añaden a las muestras criopreservantes. Algunos de estos criopreservantes pueden ser antioxidantes como el GSH (Glutation), ya sea oxidado o reducido, o el DHA (Ácido docosahexaenoico) (*Ávila-Portillo et al., 2006* y *Giaretta et al., 2015*). Cabe destacar el papel fundamental que tiene el GSH reducido para mantener el equilibrio redox intracitoplasmático de las células (*Jacob et al., 2003*), evitando así la formación excesiva de las especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden causar peroxidación lipídica de las membranas celulares del espermatozoide, afectar a la cadena

mitocondrial o axonema de los espermatozoides, provocar daños a nivel nuclear y pérdida de motilidad e infertilidad, entre otras (*Kutluyer et al., 2014*).

La crioconservación del espermatozoides a menudo provoca la eliminación del plasma del semen y causa un estrés oxidativo y un daño en el ADN de las células espermáticas (*Lopes-Santiago et al., 2012*).

1.3. Sistema redox

Las reacciones redox son un conjunto de reacciones donde se produce una pérdida de un electrón por parte de un átomo en el que se reduce (especie reducida), y ese mismo electrón es ganado por otro átomo, oxidándose (especie oxidada). Estas reacciones redox se llevan a cabo en el interior celular en lo que se conoce como metabolismo celular, destacando la cadena transportadora de electrones que existe en la membrana de las mitocondrias, donde hay múltiples complejos enzimáticos que ceden electrones (se reducen) y captan electrones (se oxidan) de forma secuencial de manera que un complejo le cede el electrón ganado al sucesivo, y así hasta completar la cadena.

Pero, para que la célula y en general el propio organismo se mantenga en condiciones estables, se requiere de un equilibrio entre la producción de sustancias oxidadas y sustancias reducidas que si se altera provoca el estrés oxidativo. Este estrés oxidativo consiste por tanto en un desequilibrio entre la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y su eliminación, generalmente mediante antioxidantes. Estas sustancias ERO se han visto que son imprescindibles para mantener el sistema osmótico del organismo, además de mantener la fisiología del semen así como su capacitación, hiperactivación o reacción acrosomal. Sin embargo, también se ha demostrado que tiene efectos adversos para mantener la integridad del ADN celular (*Gallardo, 2007*), provocando entrecruzamientos indebidos de la cromatina, cambio de bases e incluso roturas en la hebra de ADN tanto a nivel nuclear como a nivel mitocondrial (*Lopes-Santiago et al., 2012* y *Mallok et al., 2011*), así como peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas, afectando a su función y a su estructura (*Mallok et al., 2011*) disminuyendo por tanto la cavitación del espermatozoide para fecundar al óvulo, definiéndose a éste como la adquisición de la capacidad del espermatozoides eyaculado de fecundar al óvulo. También cabe destacar que las ERO, en una situación donde no haya estrés oxidativo,

también son fundamentales por ejemplo para la capacitación o para provocar cambios en la fluidez de membrana que permite la fusión del espermatozoide con la membrana pelúcida del óvulo (*Hernández-Matos et al., 2010*).

Existen dos fuentes principales de generación de ERO en el semen y son los propios espermatozoides debido a que sean inmóviles o con problemas de movilidad, o por espermatozoides que son morfológicamente normales pero que su función esté alterada y los leucocitos del líquido espermático, que en elevadas concentraciones los leucocitos al producir ERO, aumenta la concentración presente en el semen causando el estrés oxidativo.

Para evitar el estrés oxidativo, el propio organismo tiene un sistema antioxidante en el que generan antioxidantes para igualar la producción de ERO reduciendo su actividad. Los antioxidantes más destacados que llevan a cabo esta función son el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) o el glutathion peroxidasa (GPx), entre otros. Sin embargo, también hay otros antioxidantes endógenos que tienen esta capacidad como es el glutathion (GSH) (*Hernández-Matos et al., 2010*), que puede estar en dos estados, reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

1.4. Seminograma

El seminograma es un análisis del semen pero que carece de valor predictivo absoluto. Informa sobre el potencial que tiene un varón de fecundar un óvulo, que está relacionado directamente con la calidad de su semen (*Cruz et al., 2010*), lo cual ayuda a decidir qué técnica es más conveniente para la pareja infértil. Es una prueba que se puede hacer previo a un estudio para determinar la calidad del semen de los individuos que se van a emplear en el estudio.

Gracias al seminograma se puede determinar la función testicular en cuanto a producción de espermatozoides y el estado de permeabilidad de los conductos que constituyen el aparato reproductor masculino. Un seminograma que esté alterado puede indicar que fertilidad masculina disminuida pero no tiene por qué sugerir infertilidad (*Almonacid et al., 2010*).

En este análisis se realizan estudios de diferentes parámetros del semen mediante un análisis macroscópico, como viscosidad, capacidad de licuefacción, color y olor, un análisis químico a nivel de pH o un análisis microscópico en el que se

estudia la concentración del semen y su movilidad, vitalidad y morfología (*Gallardo, 2007*).

Los resultados en un mismo individuo pueden tener grandes variaciones, y en tal caso se requieren al menos de dos seminogramas en un periodo mínimo de dos meses. Los resultados de estos análisis del semen fueron estandarizados por la Organización Mundial de la Salud en 2009. Si el segundo análisis del semen indica valores fuera de estos estándares es cuando se deben comenzar un estudio de fertilidad (*Almonacid et al., 2010*).

1.5. Citómetro de flujo

La citometría de flujo es una técnica empleada comúnmente para estudiar las características tanto físicas como químicas de ciertas células que se encuentran en suspensión en un medio líquido, de tal forma que emiten alguna señal de células individuales al incidir una luz sobre la muestra y ser captada por un receptor específico. Esta técnica destaca en sí por su capacidad de medir diferentes patrones de las células estudiadas y sus características cuantitativas al mismo tiempo (*Barrera et al., 2004*).

El principio de la citometría de flujo consiste en hacer pasar los elementos a estudiar, ya sean células o partículas, por un canal muy fino en el que permite pasar elemento por elemento por ese canal, a través de los cuales incide un haz de luz. La información obtenida puede ser la dispersión de la luz o por la emisión de luz por parte de los fluorocromos de la célula o partícula al ser excitados por un rayo luminoso. Las señales luminosas emitidas se transforman en impulsos eléctricos que son amplificados y se convierten en señales digitales procesadas por una computadora (*Barrera et al., 2004*).

La citometría de flujo es una de las técnicas más precisas y objetivas en cuanto al análisis de la integridad de la cromatina espermática haciendo uso de fluorocromos específicos para ADN como el anaranjado de acridina (AA) o el yoduro de propidio (IP). En el segundo caso como ejemplo, el yoduro de propidio es un compuesto fluorescente que por estequiometría se une al ADN de forma que la emisión que se obtiene de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN que podemos encontrar en la célula. Las células apoptóticas serán teñidas con yoduro de propidio y en un análisis citométrico se puede encontrar un pico de

hipodiploidía, notablemente alejado del pico que corresponderá al ADN de una célula diploide normal (*Cruz et al., 2010*).

1.6. Antecedentes

Estudios previos sobre crioconservación de muestras han demostrado que existe un daño celular debido a la formación de cristales en el tejido celular, por ello se han buscado mecanismos que reviertan esos efectos nocivos para el semen y que ponen en riesgo la posibilidad de llevar a cabo las técnicas empleadas en esta disciplina. Uno de esos mecanismos que se ha demostrado que revierten en cierta medida el daño causado por los efectos de la cristalización del material en su congelación es la actividad de los antioxidantes, entre otros.

En algunos de estos estudios previos como se ha citado ya anteriormente fue en las investigaciones llevadas a cabo por Woods y colaboradores en 2004 donde se corroboraban que la congelación de muestras de semen provocaban problemas en la fertilidad del semen tras su congelación (*Woods et al., 2004*), debido a que a pesar de que se observaba una cavitación ligeramente disminuida del semen, pero que no afectaba al final al éxito de fecundación como se demuestra en el estudio de Nallella (*Nallella et al., 2004*) y de Gadea (*Gadea et al., 2003*), también se observaba una elevada fragmentación del ADN así como estrés oxidativo, como indica Thomson en sus estudios en 2009 (*Thomson et al., 2009*). En otros estudios también determinan que la congelación produce un daño celular por la formación de cristales intracelulares, a pesar de que es bastante complicado demostrar este hecho, como indica Acker en sus estudios llevados a cabo en 2001 (*Acker et al., 2003*).

Una consecuencia de la producción del estrés oxidativo, que es causado por la criopreservación como determinaba Thomson (*Thomson et al., 2009*), es la generación masiva de sustancias reactivas de oxígeno con sus consecuentes efectos descritos anteriormente en el subapartado de “Sistema redox”, donde aparecen estudios previos que corroboran el daño de la integridad del ADN y peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas causadas por las ERO (*Lopes-Santiago et al., 2012 y Mallok et al., 2011*).

Por ello se empezaron a llevar a cabo estudios que descubriesen compuestos que revirtiesen estos efectos de las ERO, y en varios estudios se comprobó que esas funciones las cumplían los antioxidantes.

En un estudio sobre jabalís se demostró que cuando se producía la congelación de las muestras, se reducía la producción de GSH propio del organismo y por ello en el estudio se añadió un suplemente en GSH exógeno tras la descongelación y previo a la congelación y se demostró que el GSH exógeno cuando se suplementa antes de la congelación tiene menos efecto que cuando se adiciona posterior a la congelación. Esto quizás pueda deberse a que el daño causado por la congelación en las enzimas que sintetizan los antioxidantes reducen por ende la actividad antioxidante presente en el medio causando más daño celular. Pero igualmente, en ambos casos se observaba un incremento en la cavitación del semen de jabalí en confrontación con la cavitación del semen cuando no se adicionaba GSH exógeno en ningún caso y se procedía a la congelación de la muestra. Estos estudios fueron desarrollados por Gadea y colaboradores en 2004 (*Gadea et al., 2004*).

En otro estudio sobre toros se estudió el efecto del GSH tanto oxidado como reducido y se observó que ambos provocaban también la reducción de los daños por congelación y aumentaba la cavitación del semen que en caso del control sin adición de GSH. Sin embargo se pudo observar concretamente que el GSSG tenía la capacidad de prevenir frente a la pérdida de movilidad que sufren los espermatozoides por la congelación (*Chatterjee et al., 2001*).

Por último, otro experimento desarrollado con jabalís también demostró el efecto positivo que tiene la adición de DHA en el semen para su preservación frente a la congelación mejorando la calidad del semen en el proceso de congelación-descongelación (*Kaeoket et al., 2010*).

1.7. Justificación y objetivos

A día de hoy existe una gran problemática en cuanto a la infertilidad de la población humana en el que año tras año va aumentando más los casos. Esta infertilidad puede ser causada por miles de factores que alteren de cualquier forma a los espermatozoides u óvulos cuando están dentro del organismo, causando más

infertilidad masculina que femenina, ya se traten de factores ambientales o genéticos.

Es por la elevada tasa de infertilidad que existe actualmente, que se recurren más a métodos de reproducción asistida ya que además se ha visto que tiene su porcentaje de éxito. Sin embargo, siempre se pueden mejorar las condiciones para el desarrollo en estas técnicas y aumentar la fiabilidad, calidad y porcentaje de éxito, e incluso abaratar los costes de estos procesos, que en muchos casos son inalcanzables económicamente para gran parte de la población. Es así como surgieron las técnicas IMSI (Intra-cytoplasmatic Morphologically-selected Sperm Injection) a partir de la ICSI (Intra-cytoplasmatic Sperm Injection), o la técnica MACS (Magnetic Activated Cell Sorting). Pero con el avance de la ciencia se puede mejorar también estas técnicas y crear otras nuevas.

Sin embargo a mediados del siglo XX se había visto que para desarrollar las técnicas empleadas en reproducción asistida era necesaria la conservación de las muestras para un posterior uso o para un transporte del material, y fue entonces cuando surgió la crioconservación. Pero este procedimiento de conservación se observó que presentaba muchísimos problemas en cuanto a la viabilidad del semen, de su capacidad de fecundar al óvulo, que se veía muy menguada al descongelar el semen. Desde entonces muchos estudios han tratado de determinar las causas que producen estos descensos en la capacidad de fecundación del semen y qué soluciones se podrían emplear para revertir este hecho. Así fue como se vio que la causa principal era un estrés oxidativo que provocaba una elevada actividad oxidativa por parte de las ERO, por ello una solución fue añadir más antioxidantes que contrarrestasen la actividad de estas sustancias ERO.

Por tanto el estudio que se pretende desarrollar es determinar si los antioxidantes añadidos en semen de rata mejoran la fecundidad de un espermatozoide cuando se descongela y qué antioxidantes en concreto presentan una mayor eficacia protectora frente a la congelación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este procedimiento experimental se emplearon ratas procedentes del animalario de la Universidad de Jaén (Jaén, España), mantenidas en unas condiciones *ad libitum* de alimentación y bebida y con un ciclo de luz/oscuridad de

12h/12h. El material empleado en este estudio procede de los animales del animalario destinado a prácticas de la asignatura de Bases Biológicas de la Reproducción Humana, impartida en la Universidad de Jaén, y cuenta con la aprobación por parte del Comité de bioética de la Universidad de Jaén (*Anexo I*).

2.1. Extracción del semen

Para la obtención del semen, se realizó una extracción de los dos epidídimos de la rata macho. Una vez aislado del organismo del animal, a los epidídimos se le extrajeron la mayor cantidad posible de semen, ya que son en los epidídimos donde se encuentran los espermatozoides ya maduros y listos para la fecundación. Para ello se preparó anteriormente un medio diluyente para el semen, el diluyente TRIS-glucosa, que estaba compuesto por 2.24 g de hidroximetilaminometano (TRIS), 1.5 g de ácido cítrico, 0.96 g de glucosa, 6 ml de glicerol y un 10% de yema de huevo. Una vez preparado el diluyente, se añadieron los epidídimos troceados y con una paletilla pequeña se les presionó a los trozos para permitir salir a los espermatozoides de los epidídimos y que se mezclasen en el diluyente, para así posteriormente recoger, mediante el uso de una pipeta Pasteur, el diluyente cargado con los espermatozoides y conservarlos y dosificarlos en tubos eppendorfs. En concreto para cada rata, de la cual se puede obtener 2 epidídimos diferentes, se pudo conseguir un total de 4 eppendorfs, que corresponden a 2 eppendorfs por cada epidídimo, ya que estos tubos eppendorfs posteriormente se pueden diluir cuantas veces se desee. Estos tubos fueron conservados inicialmente a 37°C que sería la temperatura normal en la que se encontrarían los espermatozoides dentro del organismo del animal, y cuando correspondió, finalmente fueron conservados en un congelador a -20°C.

2.2. Análisis del semen

Del material sobrante sin dosificar en esos 4 tubos eppendorfs iniciales, se pudo obtener otro eppendorf con semen diluido en TRIS-glucosa para realizar el estudio del semen, el seminograma, que como previamente se había citado, en numerosas ocasiones son imprescindibles hacer este estudio para determinar a groso modo qué factores pueden estar influenciando en la incapacidad de una pareja de concebir. También se realizó un estudio del semen tras el proceso de

descongelación para comparar las condiciones de fecundidad que tiene el empleo de semen fresco frente al empleo de semen tras un proceso de congelación sin ayuda de protectores.

En este estudio del seminograma, de todas las variables que se podrían estudiar, en este experimento tan solo se estudiaron las variables de licuefacción, aspecto y viscosidad como variables macroscópicas, el pH como variables químicas y motilidad y vitalidad del semen para variables microscópicas.

2.2.1. Licuefacción.

Una vez obtenido el material se dejó mantener el tubo eppendorf a temperatura ambiente por unos 15 min a 30 min, y pasado ese periodo se observó si cada muestra había licuado o no. En el caso de que no hubiera ocurrido, se observaba si existían grumos, hebras o coágulos.

2.2.2. Aspecto o color.

Tras la licuefacción se observaba el color que presentaba la extracción en sí, es decir, el aspecto del diluyente con el semen inmerso en él, y si presentaba un color anaranjado o gris opalescente, en el cual la muestra presentaba un color normal, pero si era más rojizo o marrón indicaba presencia de hematíes, e incluso si estaba más amarillento podía implicar ictericia o alta concentración de vitamina B12.

2.2.3. Viscosidad.

Para observar la viscosidad tan solo hubo que dejar caer una gota de la solución con el uso de una pipeta Pasteur y se observaba si la caída de la gota era fluida o era más densa, indicando en el último caso más viscosidad.

2.2.4. El pH.

El estudio del pH tan solo consistió en emplear tiras reactivas que se sumergieron en la solución con el semen y se observaba al color en el que viraba la tira reactiva, y usando un patrón marcado en el envase de las tiras reactivas se determinó su pH en función del color al que se asemejase el obtenido de la tira con respecto al patrón.

2.2.5. Motilidad o movilidad.

La motilidad se usó para ver el porcentaje de espermatozoides que tras su extracción aún conservaban su movilidad. Para ello generalmente se empleó una

gota de semen y se depositó entre un porta, previamente mantenido a 37°C, y un cubre de forma que se generaba una película fina que permitía determinar de manera más o menos precisa el porcentaje de espermatozoides móviles, e incluso valorar si el tipo de movimiento celular era normal o no. Este estudio debía ser lo más rápido posible ya que es dependiente del tiempo y cuanto más tiempo pasase, más muerte celular habría y por ende menos porcentaje de espermatozoides móviles habría.

Para determinar este porcentaje se cuantificaron 100 espermatozoides por porta. Para hallar el valor tan solo se siguió la Figura 1.

$$\% \text{ Motilidad} = \frac{\text{esperma móvil}}{\text{esperma móvil} + \text{esperma no móvil}} \times 100$$

Figura 1. Fórmula para determinar el % de semen móvil.

2.2.6. Vitalidad.

La vitalidad nos indica el porcentaje de espermatozoides vivos que se mantienen en la muestra. Este valor es importante estudiarlo porque determina la cantidad de espermatozoides y por ende su % con capacidad de fecundar un óvulo, aumentando así la probabilidad de fecundación.

Para estudiar la vitalidad se empleó la tinción eosina-nigrosina, previamente preparada, de tal forma que el colorante eosina tiñe de rojo a aquellos espermatozoides que al morir permiten al colorante atravesar la membrana al estar dañada, y el resto eran espermatozoides vivos, es decir, que se mantenían sin teñir.

En la preparación de la muestra a observar por el microscopio, primero se realizó una mezcla de colorante eosina-nigrosina con semen y se dejó reposar durante 30 segundos a temperatura ambiente. Se tomó una pequeña muestra de esa mezcla en un portaobjetos, previamente mantenido a 37°C, y se realizó un frotis y se dejó secar. Se empleó un medio de montaje y se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio. Había que contabilizar al menos 200 espermatozoides y se calculaba su porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. El límite inferior de referencia para evaluar la vitalidad de esta tinción debía de ser del 58%.

Para la preparación del colorante eosina-nigrosina se empleó 0.67 g de eosina (*Sigma-Aldrich, España*) y 0.9 g de cloruro de sodio disueltos en un volumen final de 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de vidrio y colocado en

una placa caliente de agitación. Calentar suavemente y añadir 10.0 g de nigrosina (*Sigma-Aldrich, España*) y disolver antes de que hierva la preparación. Cuando alcance la ebullición, se retira el vaso de la placa caliente y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se filtra el contenido en un recipiente nuevo y se conserva a 4°C en un frasco de vidrio.

2.3. Conservación de las muestras por congelación

Para estudiar la eficacia en la protección de ciertos antioxidantes frente al proceso de congelación, se emplearon los antioxidantes glutathion reducido (GSH) (*Sigma-Aldrich, España*), el glutathion oxidado (GSSG) (*Sigma-Aldrich, España*) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (*Merck, España*), de tal forma que en esta parte del experimento se usó 3 tratamientos y un control en el que no se empleó ningún antioxidante. Por ello, una vez obtenido el material, se tuvo 4 eppendorfs por rata que se empleaba para cada tratamiento, el primer eppendorf era un control sin ningún antioxidante, en el segundo eppendorf se usó el DHA, en el tercero se usó el GSH y por último en el cuarto eppendorf se usó el GSSG.

Cada antioxidante estaba a una concentración determinada de forma que el DHA se usaba a una concentración de 0.5 mmol/l, el GSH estaba a una concentración de 1.5 mmol/l y el GSSG estaba a una concentración de 1.5 mmol/l (*Kutluyer et al., 2014*). Para su preparación se determinaron las cantidades a medir en un peso con respecto a la concentración inicial que había en los recipientes donde se conservaban los antioxidantes y se diluyeron en medio diluyente TRIS-glucosa.

Los eppendorfs obtenidos de la extracción del semen tras un periodo de conservación a 37°C fueron centrifugados a 800 G durante 3 min. Posteriormente se les eliminaron el sobrenadante y a cada eppendorf se le añadió el tratamiento correspondiente en un volumen final de 1.5 ml de diluyente preparado, donde había un diluyente control sin ningún antioxidante, un diluyente preparado con DHA, otro con GSH y otro preparado con GSSG.

La distribución de las muestras se observan en la Tabla 1 para un número de 5 ratas empleadas en total para este experimento.

Tabla 1. Distribución de las muestras y los tratamientos.

	Control	DHA	GSH	GSSG
Rata 1	1.1	1.2	1.3	1.4
Rata 2	2.1	2.2	2.3	2.4
Rata 3	3.1	3.2	3.3	3.4
Rata 4	4.1	4.2	4.3	4.4
Rata 5	5.1	5.2	5.3	5.4

Abreviaciones: DHA, ácido docosahexaenoico; GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido.

Se dejó actuar al antioxidante en cada eppendorf durante un periodo de 60 min y posteriormente se conservaron las muestras en un congelador a -20°C hasta su uso para los análisis citométricos. Para llevar a cabo estos estudios, cada muestra fue dividida tras su descongelación en el número de subdivisiones de la muestra dependiendo del número de análisis que se iban a realizar. En concreto, las muestras fueron subdivididas en tres elementos de muestra, uno para el estudio de producción de ERO, otro para el estudio de la condensación de la cromatina y el último para el estudio del estado de la membrana, con un volumen para cada estudio de 0.5 ml del eppendorf que se rellenó con medio PBS para facilitar el manejo de las muestras.

2.4. Estudios citométricos

Los estudios citométricos a desarrollar en este experimento como se han enumerado anteriormente fueron el estudio de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante el 2'-7'-dicloro-dihidro-fluorescein-diacetato (H₂DCFDA) (*Sigma-Aldrich, España*), que como consecuencia de su presencia, las ERO, provocan alteraciones en la condensación de la cromatina del espermatozoide y en el estado de la membrana. Por tanto estos factores también fueron estudiados por citometría en el caso de la condensación de la cromatina con el uso del fluorocromo ioduro de propidio (IP) (*Sigma-Aldrich, España*) y en el caso del estado de la membrana por el uso del fluorocromo Merocianina 540 (M540) (*Sigma-Aldrich, España*). El citómetro empleado pertenece a la Universidad de Jaén, con modelo LRSFORTESSA (BD; *Becton, Dickinson and Company*) y posteriormente se analizaron los datos mediante el programa *Flowing Software 2.1* para Windows.

2.4.1. Producción de ERO.

La presencia de especies reactivas de oxígeno o su ausencia se determina por la sustancia 2'-7'-dicloro-dihidro-fluorecein-diacetato (H₂DCFDA). Esta sustancia fluorescente es comúnmente usado para detectar al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Mi Jung et al., 2005) ya que fue con esa sustancia con la primera que se observó que reaccionaba en presencia de peroxidasa (LeBel et al., 1992). Al oxidarse el H₂DCFDA se convierte en 2'-7'-dicloro-fluorecein y en el proceso se emite fluorescencia que es captado por el citómetro de flujo. Pero además de determinar la presencia de ERO como el H₂O₂, también actúa frente a otras especies como es el hidroxilo radical (*OH) o el anión superóxido (O₂*-). En este procedimiento experimental se empleó por tanto el H₂DCFDA en una concentración 0.25 µM preparado con medio PBS.

Tras la descongelación de la muestra, se procedió a la centrifugación del material durante 3 min a 800 G. Se eliminó el sobrenadante y se le añadió el medio PBS ya preparado con H₂DCFDA. Se mantuvo en reposo la muestra durante 90 min a temperatura ambiente y una vez incubado durante ese periodo de tiempo se observó la fluorescencia que emitía el H₂DCFDA por el citómetro de flujo a una absorbancia de 525 nm.

2.4.2. Estado de la condensación de la cromatina.

En el estudio del material genético es comúnmente empleado el fluorocromo ioduro de propidio (IP) ya que se trata de un agente intercalar que se une al ADN por intercalación entre los pares de bases y cuando esto ocurre, la fluorescencia del IP se ve aumentada entre 20 y 30 veces. También es bastante empleado en el estudio de apoptosis celular ya que el IP es impermeable a las membranas y sólo entrará en el ADN en aquellas células donde haya ocurrido ya la apoptosis.

Por tanto, para estudiar el estado de la condensación de la cromatina, las muestras correspondientes fueron centrifugadas previamente a 800 G durante 3 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadió Etanol-PBS al 70% de etanol, para permitir la entrada del IP en la célula muerta por el etanol, ya que el IP es impermeable a la membrana. Se mantuvo durante 30 min en este medio y se volvieron a centrifugar las muestras a 800 G durante otros 3 min. Tras eliminar el sobrenadante, se añadió 1ml de medio PBS a cada muestra y 40 µl de IP (1mg/ml) y se incubaron en oscuridad durante un periodo de 60 min. Una vez llevado a cabo

este procedimiento, se realizó la lectura de fluorescencia por citometría de flujo a una absorbancia de 650 nm.

2.4.3. Estado de la membrana lipídica.

En este apartado se empleó la técnica fluorescente con merocianina 540 (M540), compuesto útil para el estudio de las alteraciones en cuanto a la organización y arquitectura de los lípidos que componen la membrana celular. La M540 se une a membranas que poseen una alta desestabilización lipídica causados probablemente por cambios de temperatura a las que están sometidas las células espermáticas (*Restrepo et al., 2013*).

Tras la descongelación de las muestras y el periodo de centrifugación de 3 min a 800 G, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de M540 a 1 mM, previamente preparado con medio PBS. Se dejaron incubar las muestras por un periodo de 24 h a temperatura ambiente, y posteriormente se estudiaron los resultados por citometría de flujo a una absorbancia de 525 nm para determinar el desorden lipídico de la membrana en cada tratamiento.

2.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico *Statgraphics Centurion XVI.II* para Windows 32 bits, y fueron representados con la media $\pm$ desviación estándar. Las diferencias entre los tratamientos fueron analizados para unos niveles de confianza del 95% ($P < 0,05$) de la prueba de Kruskal-Wallis, mediante comparación de los tratamientos con antioxidantes frente al control y entre los tratamientos con los antioxidantes.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis seminal

Los análisis seminales, como previamente se indicó, son importantes para determinar la calidad del semen y verdaderamente útiles para determinar el tratamiento a emplear para cada caso. Por ello para determinar la calidad del semen de rata empleado en el estudio, se realizó un seminograma.

Tabla 2. Resultados del seminograma antes de la congelación y tras la descongelación del material.

	PRECONGELACIÓN			POSTCONGELACIÓN		
	Rata 1	Rata 2	Media	Rata 1	Rata 2	Media
pH	6,5	6,5	6,5	7	6,5	6,75
Movilidad	84%	77%	80,5%	0%	0%	0%
Vitalidad	89%	81%	85%	12%	4%	8%

Los resultados fueron obtenidos a partir de un valor de n=100 para el caso de la movilidad y de n=200 para el caso de la vitalidad, siendo n el número de espermatozoides contabilizados.

En los resultados obtenidos del seminograma (Tabla 2), por un lado el pH tanto para el análisis antes de la congelación como para después de la congelación se obtuvo valores muy similares lo cual indica que la congelación no causa muchas alteraciones en cuanto al pH, o al menos en este estudio.

En cuanto a movilidad, se puede observar una clara disminución de este valor hasta tal punto de desaparecer en este estudio (Tabla 2), debido principalmente a los procesos de congelación que tienen sobre los espermatozoides que provocan una disminución en gran parte de la capacidad del semen de alcanzar al óvulo y fecundarlo mediante la movilidad. Normalmente debería de aparecer al menos un pequeño porcentaje de movilidad en semen tras congelación, siempre menor al caso del semen antes de la congelación, pero en este estudio al final ha desaparecido la totalidad de la movilidad que podría existir en el semen tras la congelación. Pero en general, es imprescindible tomar medidas para solventar este problema.

Y por último en cuanto a vitalidad, también se observa una clara disminución con respecto al análisis seminal antes de la congelación (Tabla 2), ya que los procesos de congelación como se indicaron previamente tienden a causar apoptosis celular por daño en el ADN celular. En este caso aparece vitalidad pero demasiado baja con respecto a lo normal cuando se congela con referencia a estudios previos observados. Pero también es la vitalidad un factor importante que aparece como problemática en la congelación de semen y para el cual también es importante buscar y obtener soluciones.

Los otros parámetros estudiados en un seminograma, o al menos en este estudio, fueron la licuefacción, el color o aspecto de la extracción y la viscosidad. Para todos ellos se obtuvieron valores iguales para todas las ratas por tanto se puede determinar que no existe influencia de la congelación sobre estos parámetros. Los resultados obtenidos para estos parámetros fueron un color o aspecto nacarado-

grisáceo del extracto lo cual indica aspecto normal, que no tenía viscosidad, es decir, el extracto era fluido, y se producía licuefacción tras un periodo de tiempo de la extracción del material.

3.2. Estudio de la producción de ERO

Bien es sabido que como consecuencia de la congelación, se produce un desequilibrio entre especies donadoras de electrones y especies receptoras de ellas causando el estrés oxidativo, provocando de forma específica una disminución de la actividad antioxidante frente a la actividad oxidativa, lo cual causa más daño celular a nivel interno y alteraciones tanto en el ADN como en la membrana lipídica como se observará posteriormente. Es por ello que en este estudio se observó la producción de especies reactivas de oxígeno tras el proceso de congelación para tratamientos con diferentes antioxidantes. Y para ello se empleó la citometría de flujo con el uso del fluorocromo 2'-7'-dicloro-dihidro-fluorescein-diacetato (H₂DCFDA) obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del análisis de la producción de ERO mediante citometría de flujo con 2'-7'-dicloro-dihidro-fluorescein-diacetato (H₂DCFDA).

	Individuos con fluorescencia (%)	Media Fluorescencia
Control	33,12 ± 2,86	2000,20 ± 298,06
DHA	50,26 ± 1,11	3215,76 ± 305,78
GSH	56,64 ± 5,26	4595,86 ± 65,20
GSSG	40,49 ± 16,07	3048,27 ± 1806,35

Los datos han sido representados por sus medias ± desviación estándar. Los resultados expresan el % de individuos que posee fluorescencia por la actividad del H₂DCFDA (n=2) y la media de fluorescencia H₂DCFDA obtenida en todo el tamaño muestral tomado (n=2). Resultados obtenidos por el programa estadístico *Statgraphics Centurion 16.2*. Abreviaciones: DHA, ácido docosahexaenoico; GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido.

Los datos obtenidos no son significativamente representativos ya que sus valores de P para el estudio de todos los tratamientos junto (valor de $P_{\% \text{ Indiv}} = 0.19$ y valor de $P_{\text{Media Fluor.}} = 0.19$) son mayores a 0.05 teniendo en cuenta un nivel del 95% de confianza para la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). El porcentaje de individuos con fluorescencia es aquel porcentaje de celulares que presentan fluorescencia en la región H1 (Fig. 2) (en esa región debe aparecer fluorescencia emitida independientemente de la cantidad en la que se emitía en cada unidad celular,

porque en la región fuera de H1 son valores negativos determinados como tal previamente con un control sin marcar), y este valor fue expresado en porcentaje. El valor de la media de la fluorescencia es el valor recogido a partir del citómetro en el que se determinaba la media total de fluorescencia que emitían todas las unidades celulares que se tomaron para esa región H1.

Figura 2. Histograma de control a partir del cual se determinó cuál es la región H1 para obtener los resultados en todos los muestreos realizados para el análisis de la producción de ERO. Histograma obtenido a partir del programa *Flowing Software 2.5.1*



El número total de espermatozoides analizados son de 10000 de los cuales 3514 (35,14% del total) presentaban fluorescencia en la región H1. La media de fluorescencia obtenida para esa región H1 fue de 2210,96.

En la comparación de medias dos a dos entre los tratamientos, el análisis del efecto del DHA versus el control no se obtuvo valores estadísticamente significativos para la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$) ya que se obtuvo un valor de $P = 0.12$ ($P \geq 0.05$) para el estudio del % de individuos con fluorescencia, en el que se puede apreciar en la Tabla 3 y Figura 3 un incremento en la producción de ERO anormal. Este caso ocurre de igual forma para el efecto del GSH y del GSSG frente al control, con valores de P que no son tampoco estadísticamente significativos ($P_{\text{GSH}} = 0.12$; $P_{\text{GSSG}} = 1$) para la prueba de Kruskal-

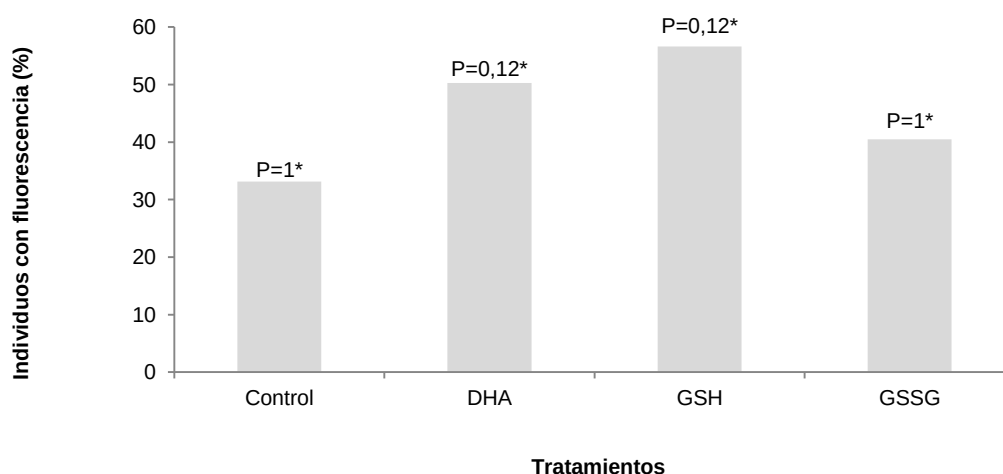
Wallis con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$). Estos mismos valores son obtenidos en el análisis estadístico para la media de fluorescencia.

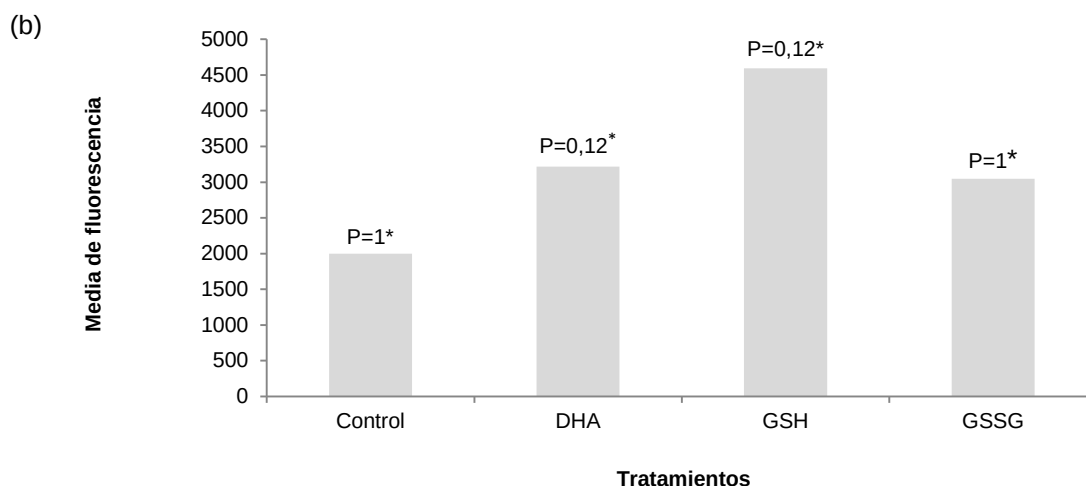
Obviando por tanto los valores de control y realizando una comparación entre tratamientos, para el parámetro del % de individuos con fluorescencia, el tratamiento con GSH alcanzó valores de fluorescencia mayores al resto obteniéndose valores no significativos estadísticamente entre GSH-DHA y GSH-GSSG ($P_{\text{GSH-DHA}}=0.12$ y $P_{\text{GSH-GSSG}}=0.12$) para la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$), siendo en el tratamiento con DHA mayor que con el tratamiento con GSSG obteniéndose valores tampoco significativos estadísticamente ($P_{\text{DHA-GSSG}}=1$) para la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$) (Fig. 3a y Tabla 3).

Para el otro parámetro de la media de fluorescencia observada, los valores de fluorescencia también son los más altos con el tratamiento con GSH, y ligeramente mayores en el tratamiento con DHA con respecto al tratamiento con GSSG, obteniéndose los mismos valores estadísticos en las comparaciones dos a dos de los tratamientos con respecto al estudio del % de individuos con fluorescencia para la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$).

Figura 3. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el análisis de la producción de ERO mediante citometría de flujo con 2'7'-dicloro-dihidro-fluorescein-diacetato (H_2DCFDA).

(a)





(a) Representación de las medias y su desviación estándar en un diagrama de barras del porcentaje de individuos con fluorescencia de H₂DCFDA (n=2), obtenido mediante el *Excel 2010*. (b) Representación de las medias y su desviación estándar en un diagrama de barras del valor medio de fluorescencia H₂DCFDA (n=2), obtenido mediante el *Excel 2010*. Abreviaciones: DHA, ácido docosahexaenoico; GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido.

* Valores de P en comparaciones dos a dos de los tratamientos con antioxidantes frente al control para la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significación del 95% (P<0.05).

3.3. Estado del estado de la condensación de la cromatina

En la maduración nuclear del espermatozoide se debe de producir una condensación de la cromatina, donde se produce una sustitución de proteínas histonas por proteínas básicas o protaminas. Sin embargo, lo que ocurre en ocasiones es que no todas las proteínas histonas son sustituidas por protaminas lo cual no permite obtener una condensación de la cromatina espermática normal y se ha observado que son en estos espermatozoides donde no se producen una correcta condensación de la cromatina los que están relacionados con anomalías tanto en el seminograma como en la alteración de la capacidad de fecundación del espermatozoide, siendo solo aquellos que sí han completado este proceso los que tienen la capacidad de fertilizar (*Fernández et al., 2001*).

Por ello se empleó el fluorocromo yoduro de propidio para evaluar el estado de la cromatina cuando se descongelaban las muestras mediante citometría de flujo obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 4).

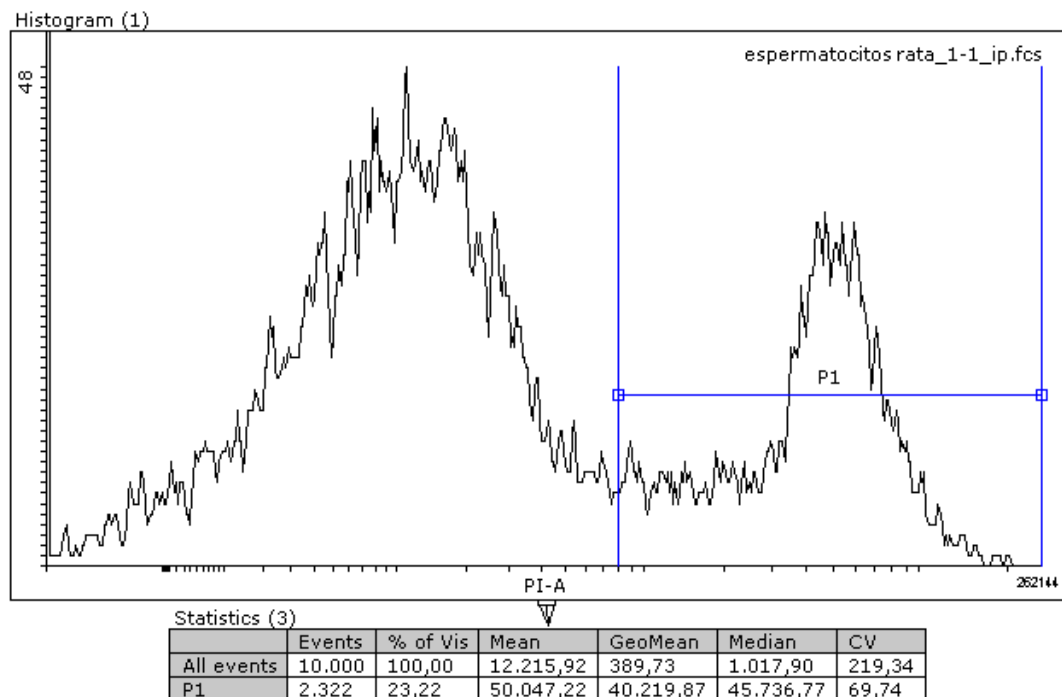
Tabla 4. Resultados del estudio del estado de la condensación de la cromatina mediante citometría de flujo con ioduro de propidio.

	Individuos con fluorescencia (%)	Media Fluorescencia
Control	23,21 ± 11,20	51416,8 ± 4237,1
DHA	04,73 ± 3,63	35179,8 ± 856,6
GSH	21,06 ± 14,19	44629,3 ± 912,5
GSSG	17,60 ± 16,26	45527,3 ± 6545,3

Los datos han sido representados por sus medias $\pm$ desviación estándar. Los resultados expresan el % de individuos que posee fluorescencia por la actividad del ioduro de propidio (n=3) y la media de fluorescencia de ioduro de propidio obtenida en todo el tamaño muestral tomado (n=3). Resultados obtenidos por el programa estadístico *Statgraphics Centurion 16.2*. Abreviaciones: DHA, ácido docosahexaenoico; GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido.

El porcentaje de individuos que presentaban fluorescencia estadísticamente no era lo suficientemente significativo estadísticamente para el estudio de los tratamientos en conjunto (valor de $P=0.18$; $P \geq 0.05$), es por ello que se analizó también la media de la fluorescencia obtenida donde se observó diferencias significativas estadísticamente hablando para el estudio del conjunto de los tratamientos (valor de $P=0.03$; $P < 0.05$) en esta medida, con un nivel de un 95% de confianza para la prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados fueron tomados con el mismo procedimiento explicado anteriormente para el análisis de la producción de ERO, delimitando en este caso una región P1. El histograma resultante se muestra en la Figura 4.

Figura 4. Histograma de control a partir del cual se determinó cuál es la región P1 para obtener los resultados en todos los muestreos realizados para el estudio de la condensación de la cromatina. Histograma obtenido a partir del programa *Flowing Software 2.5.1*

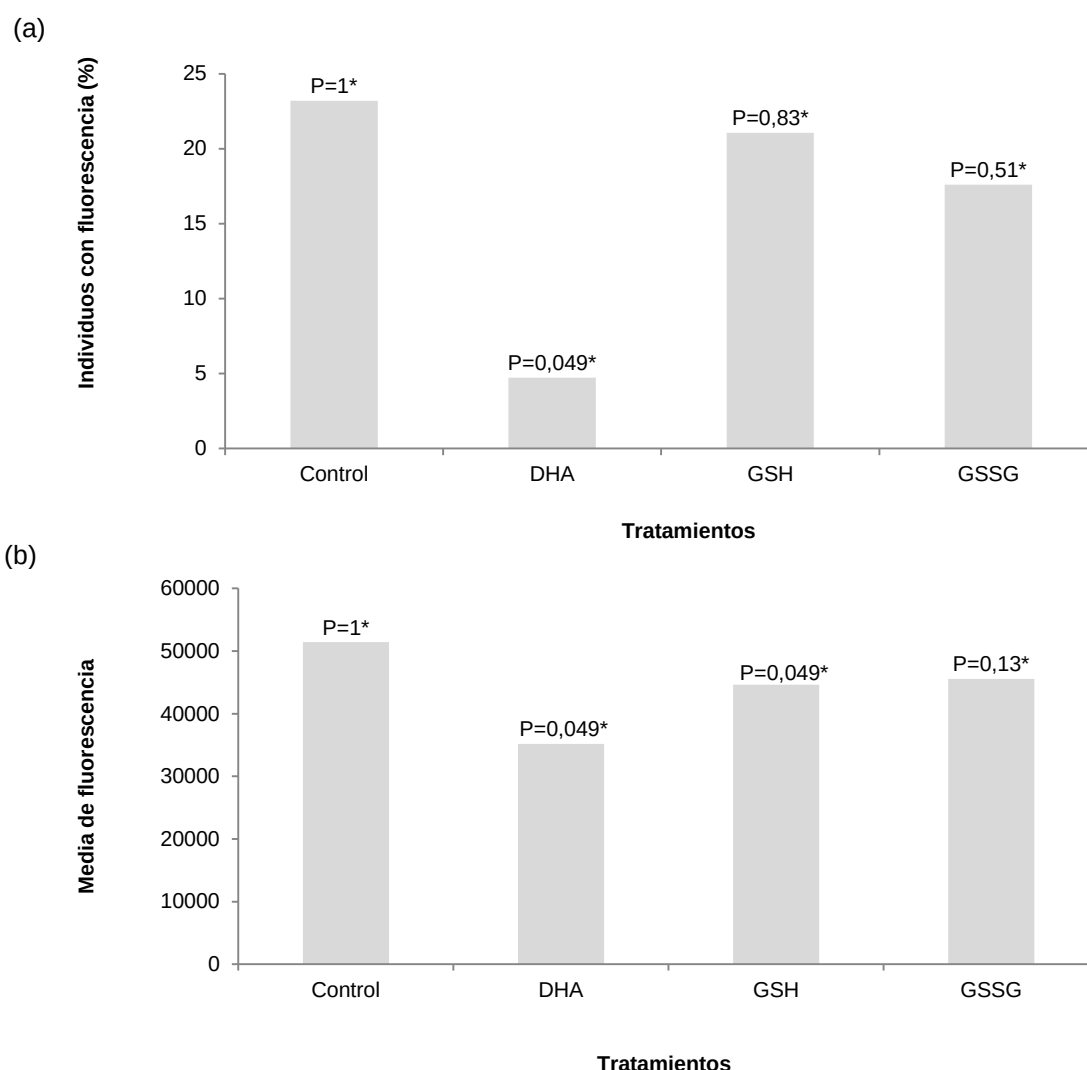


El número total de espermatozoides analizados son de 10000 de los cuales tan solo 2322 (23,22% del total) presentaban fluorescencia en la región P1. La media de fluorescencia obtenida para esa región P1 fue de 50047,22.

Para la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$) en el estudio de todos los análisis estadísticos dos a dos de los tratamientos, los resultados obtenidos por citometría de flujo con ioduro de propidio reflejaron en el caso del % de individuos una disminución del valor de individuos (espermatozoides) que presentaron ioduro de propidio en su estructura del ADN en el tratamiento con el antioxidante DHA con respecto al control, obteniéndose un valor estadísticamente significativo de P ($P_{\text{Control-DHA}} = 0.049$). Sin embargo, en los otros tratamientos con GSH y GSSG también se pudo apreciar una ligera disminución de estos valores aunque no estadísticamente significativos ($P_{\text{Control-GSH}} = 0.83$ y $P_{\text{Control-GSSG}} = 0.51$), siendo mayor en este caso en GSSG que en GSH ($P_{\text{GSH-GSSG}} = 0.83$) estadísticamente no significativo, pero en ambos casos desempeñando una peor protección como antioxidantes para la congelación con respecto al DHA ($P_{\text{DHA-GSH}} = 0.13$ y $P_{\text{DHA-GSSG}} = 0.13$) tampoco estadísticamente significativo (Fig. 5a, Tabla 4). En el análisis de los resultados por citometría de flujo con ioduro de propidio para la media de fluorescencia, también se puede observar que existe una reducción

significativa en el caso del DHA de la fluorescencia media emitida en esa región P1 ($P_{\text{Control-DHA}}=0.049$), pero menos apreciable para los tratamientos con los antioxidantes GSH ($P_{\text{Control-GSH}}=0.049$) siendo estadísticamente significativa en este caso, y GSSG ($P_{\text{Control-GSSG}}=0.13$) siendo no significativa estadísticamente. Los valores con el tratamiento GSH son menores a los valores con GSSG ($P_{\text{GSH-GSSG}}=0.83$) siendo valores no significativos estadísticamente, en contraposición con lo observado con el porcentaje de individuos con fluorescencia (Fig. 5b, Tabla 4).

Figura 5. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el estudio de la condensación de la cromatina mediante citometría de flujo con ioduro de propidio (IP).



(a) Representación de las medias y su desviación estándar en un diagrama de barras del porcentaje de individuos con fluorescencia IP (n=3), obtenido mediante el *Excel 2010*. (b) Representación de las medias y su desviación estándar en un diagrama de barras del valor medio de fluorescencia IP (n=3), obtenido mediante el *Excel 2010*. Abreviaciones: DHA, ácido docosahexaenoico; GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido.

* Valores de P en comparaciones dos a dos de los tratamientos con antioxidantes frente al control para la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significación del 95% ($P<0.05$).

3.4. Estudio del estado de la membrana lipídica

Los procesos de congelación-descongelación producen incrementos en la rigidez de la membrana plasmática de los espermatozoides y en muchos casos induce a un aumento en la ratio colesterol/fosfolípido. La fluidez de la membrana depende del colesterol contenido en la membrana y del grado de saturación de los ácidos grasos que componen la membrana lipídica, ya que son estos dos componentes los que más tienden a volverse rígidos y modificar la fluidez de la membrana (Blesbois *et al.*, 2005), además de provocar despolarización de las membranas causando una alteración en la función de los canales de calcio afectando a la reacción del acrosoma (Rossato *et al.*, 2000). Por tanto el proceso de congelación-descongelación es un proceso que también hay que controlar y regular para buscar alternativas que eviten la rigidez de estos elementos bioquímicos y por ende de la fluidez y de la integridad de la membrana.

Es por tanto que en este estudio se estudió el estado de la integridad de la membrana mediante citometría de flujo con Merocianina 540 y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del estudio del estado de la membrana lipídica mediante citometría de flujo con Merocianina 540.

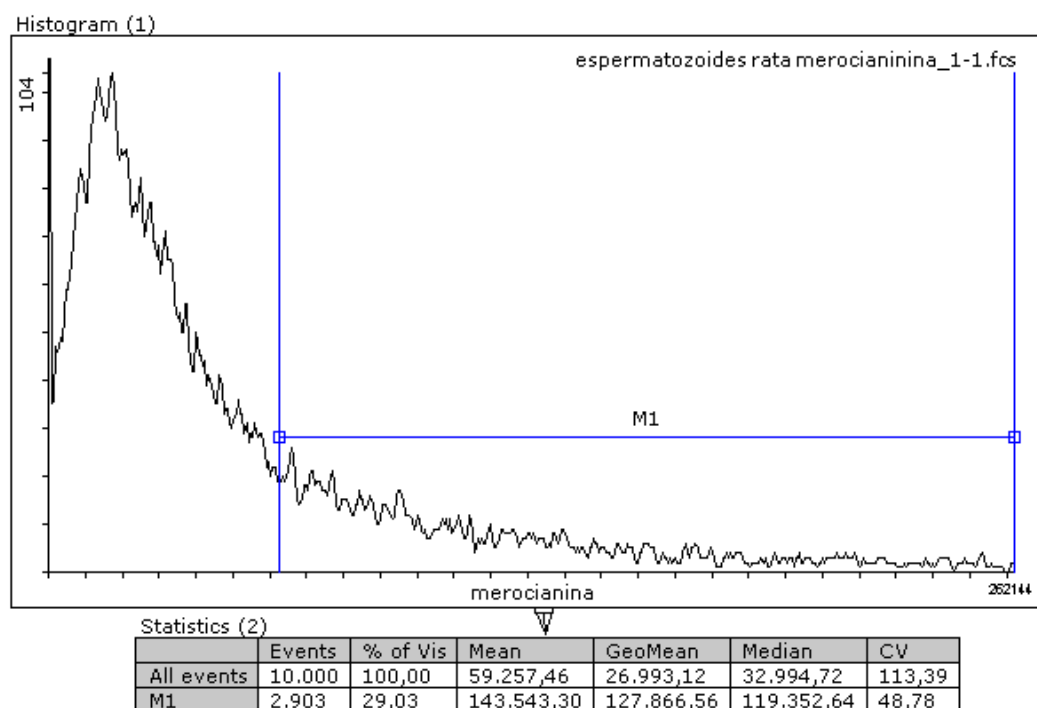
	Individuos con fluorescencia (%)	Media Fluorescencia
Control	37,72 ± 12,26	155553 ± 17062,6
DHA	15,49 ± 1,75	137430 ± 6739,8
GSH	40,25 ± 0,14	155135 ± 196,6
GSSG	44,20 ± 17,51	153804 ± 6433,7

Los datos han sido representados por sus medias ± desviación estándar. Los resultados expresan el % de individuos que posee fluorescencia por la actividad de la M540 (n=2) y la media de fluorescencia de M540 obtenida en todo el tamaño muestral tomado (n=2). Resultados obtenidos por el programa estadístico *Statgraphics Centurion 16.2*. Abreviaciones: DHA, ácido docosaheptaenoico; GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido.

Tanto los valores del % de individuos con fluorescencia como la media de fluorescencia de M540 obtenida no son estadísticamente significativos ya que sus valores de P (valor de $P_{\% \text{ Indiv}} = 0,24$ y valor de $P_{\text{Media Fluor.}} = 0,26$) son mayores a 0,05 para un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$) en una comparación estadística dos a dos de los tratamientos en conjunto. Al igual que con los estudios con yoduro de

propidio y H₂DCFDA, los resultados fueron obtenidos a partir de una región seleccionada de toda la estudiada en el citómetro de flujo, la región M1 en este caso, que se tomó a partir de un control constante para el resto de muestreos. Esta región se creó a partir de un histograma de uno de los controles que se representa en la siguiente figura (Fig. 6).

Figura 6. Histograma de control a partir del cual se determinó cuál es la región M1 para obtener los resultados en todos los muestreos realizados para el estudio del estado de la membrana lipídica. Histograma obtenido a partir del programa *Flowing Software 2.5.1*

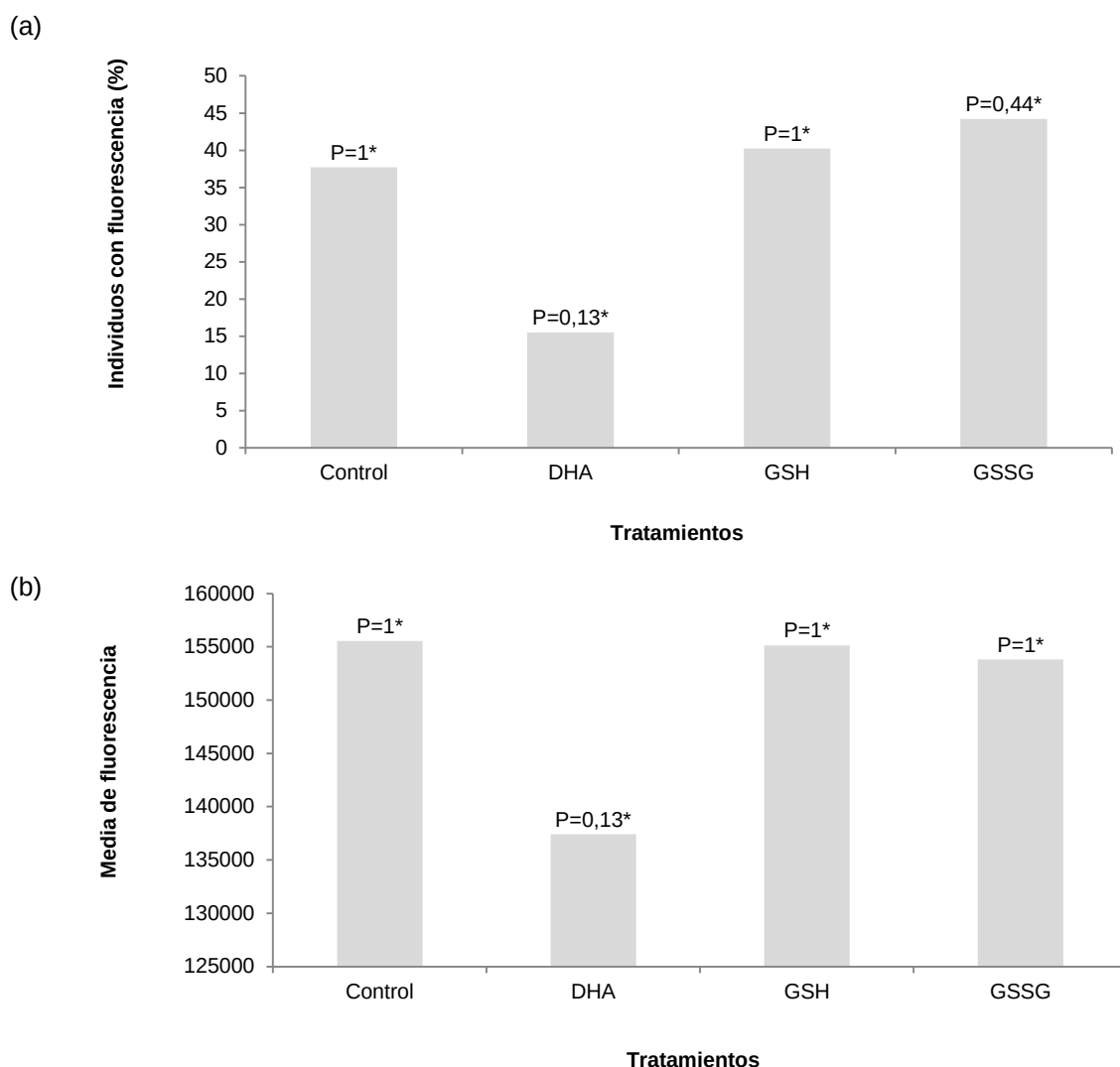


El número total de espermatozoides analizados son de 10000 de los cuales tan solo 2903 (29,03% del total) presentaban fluorescencia en la región M1. La media de fluorescencia obtenida para esa región M1 fue de 143543,3.

Para un valor de confianza del 95% ($P < 0.05$) en la prueba de Kruskal-Wallis, se pudo determinar que al igual que con el ioduro de propidio, existía una reducción de fluorescencia para la conservación con DHA ($P_{\text{Control-DHA}} = 0.13$), a diferencia de GSH y GSSG ($P_{\text{Control-GSH}} = 1$ y $P_{\text{Control-GSSG}} = 0.44$) siendo en ningún caso estadísticamente significativo los valores (Fig. 7a, Tabla 5), incluso existe mayor diferencia respecto al control en los tratamientos con GSH y GSSG, lo cual indicaría que perjudicaría a la muestra. En cuanto a la media de fluorescencia emitida también existe un descenso de media para la conservación con DHA aunque no estadísticamente significativa ($P_{\text{Control-DHA}} = 0.13$), y en este parámetro, a diferencia del % de individuos con fluorescencia, sí que se puede observar una ligera disminución

tanto de GSH como de GSSG versus el control aunque tampoco estadísticamente significativo ($P_{\text{Control-GSH}}=1$ y $P_{\text{Control-GSSG}}=1$), siendo muy ligeramente menor para el GSSG con respecto a GSH ($P_{\text{GSH-GSSG}}=1$), valor no significativo estadísticamente (Fig. 7b, Tabla 5).

Figura 7. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el estudio del estado de la membrana lipídica mediante citometría de flujo con M540.



(a) Representación de las medias y su desviación estándar en un diagrama de barras del porcentaje de individuos con fluorescencia M540 ($n=2$), obtenido mediante el *Excel 2010*. (b) Representación de las medias y su desviación estándar en un diagrama de barras del valor medio de fluorescencia M540 ($n=2$), obtenido mediante el *Excel 2010*. Abreviaciones: DHA, ácido docosahexaenoico; GSSG, glutathion oxidado; GSH, glutathion reducido.

* Valores de P en comparaciones dos a dos de los tratamientos con antioxidantes frente al control para la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significación del 95% ($P<0.05$).

4. DISCUSIÓN

Tras obtener esta serie de resultados en general se ha podido observar el efecto negativo de la congelación sobre las propiedades físico-químicas de las células, alterando por ende su morfología, su fisiología y a groso modo causando disminución en la movilidad del semen e incluso de la vitalidad de las células espermáticas.

En este estudio tras el análisis del semen se pudo observar una importante pérdida de movilidad de hasta su desaparición lo cual en estudios previos no ocurre, y esto lleva a indicar que probablemente se haya debido a un problema existente con respecto a la temperatura a la hora de realizar el conteo de movilidad, por ello obviando estos resultados de 0% de movilidad, se puede decir, con respecto a estudios previos que la movilidad se ve bastante reducida (*O'Connell et al., 2002*). Y algo semejante ocurre con la vitalidad del semen en el que se produce un importante decremento de los niveles de vitalidad con respecto a estudios previos en el que no se produce un descenso tan pronunciado (*Estevez et al., 2000*). La mortalidad espermática observada por la crioconservación puede estar causada por los crioprotectores, estrés celular y estrés osmótico (*Stomelli et al., 2005*), afectando a la volumen espermático que sobrevive a los procesos de congelación-descongelación.

Una vez sabido y determinado que verdaderamente se produce un considerable decremento en las capacidades del semen de fecundar un óvulo al ser congelado durante el proceso congelación descongelación, se puede observar que los resultados, obviando los valores estadísticos ya que se han obtenido en la mayoría de los casos valores no significativos, son unos resultados a favor de los antioxidantes en el que cabe destacar el papel del ácido docosahexaenoico (DHA), y es que en la mayoría de los análisis realizados mediante citometría de flujo se puede observar una clara reducción de los daños causados por la congelación con respecto al control y a los otros dos antioxidantes empleados en el estudio, el GSH y el GSSG ya sea a nivel de estado de la cromatina como a nivel de estado de la membrana.

A nivel del estado de la membrana se requiere que las membranas se encuentren en un estado intacto y no alterado ya que la membrana lipídica ocupa un papel fundamental en la fusión del óvulo con el espermatozoides debido a que en un estado intacto de la membrana lipídica se favorece la fusión de la membrana

citoplasmática con la membrana acrosomal externa de la zona apical de la cabeza del espermatozoide a lo que se le llama reacción acrosomal, y un indicador del estado fecundante de un espermatozoide es determinar el estado de la membrana acrosomal. Por ello con el proceso de congelación, esta membrana acrosomal se puede ver deteriorada por un cambio en la fluidez de membrana (*Blesbois et al., 2005*) o despolarización de la membrana acrosomal, lo cual induce a una alteración en los canales presentes en la membrana voltaje-dependientes, como son los canales de calcio, alterando el flujo normal de ión a través del espermatozoide, siendo el calcio un elemento fundamental por ejemplo para la reacción acrosomal (*Rossato et al., 2000*). Todo este proceso también se puede ver influenciado por la presencia de las ERO producidas durante el proceso de congelación (*Agarwal et al., 2008*). Por ello, como se ha determinado anteriormente, la presencia de antioxidantes como el DHA provoca una disminución del daño de la membrana evitando en cierta medida la despolarización de la membrana acrosomal.

A nivel de la cromatina, se ha comprobado en estudios previos que la presencia de ERO a causa del proceso de congelación, tiene efectos adversos para mantener la integridad del ADN celular (*Gallardo, 2007*), provocando entrecruzamientos indebidos de la cromatina, cambio de bases e incluso roturas en la hebra de ADN tanto a nivel nuclear como a nivel mitocondrial (*Lopes-Santiago et al., 2012 y Mallok et al., 2011*) como se indicó anteriormente. Lo cual según los resultados obtenidos se puede determinar que la presencia de antioxidantes protege al ADN frente a la fragmentación y evita entrecruzamientos causando que haya menos condensación de la cromatina, que suele ser un indicador de apoptosis celular.

Sin embargo, en el análisis de la producción de ERO, se ha observado no solo para el DHA, sino también para los otros dos antioxidantes, GSH y GSSG, una elevada producción de especies reactivas de oxígeno con respecto al control tras el proceso de descongelación, ya que debería de ser una reducción de la producción de ERO lo que causase la adicción de los antioxidantes. Este hecho puede ser debido a algún fallo con el tratamiento control durante el procedimiento experimental. Sin embargo, obviando el dato control en el análisis de la producción de ERO, se puede observar y concluir que tanto en el % de individuos como la media de fluorescencia se produce una menor producción de ERO para el caso del DHA, a diferencia del GSH que es el que más produce, y es el GSSG el que produce una

menor cantidad de ERO de los tres antioxidantes. Sin embargo en estudios previos se pudo concluir que la adición de antioxidantes como DHA o GSH ayuda a la reducción de la producción de ERO en el medio tras el proceso de congelación (Gadea et al., 2013).

En cuanto al estudio del estado de la condensación de la cromatina y de la membrana lipídica, tanto el GSH como el GSSG han sufrido un comportamiento controvertido en cuanto a que en el primer caso del estado de la condensación de la cromatina, el GSH tenía menor efecto que el GSSG para el % de individuos con fluorescencia y sin embargo para la media de fluorescencia tanto GSH como GSSG poseían valores muy similares pero el GSH poseía un valor menor. Mientras que en el segundo caso del estudio del estado de la membrana lipídica en cuanto al % de individuos con fluorescencia eran mayores los valores del GSH y GSSG con respecto al control aunque siendo el valor de GSH menor, y en cuanto a la media de fluorescencia se obtenían valores similares entre GSH y GSSG pero en este caso el GSSG presentaba unos valores ligeramente menor. Por todo ello, al no existir una información concluyente con respecto al efecto del GSH y del GSSG sobre la criopreservación en este estudio, para obtener resultados concluyentes existen otros estudios que confirman la efectividad de la adición de GSH para la conservación del semen tras el proceso de congelación (Gadea et al., 2013) aunque no se puede decir lo mismo del GSSG donde se ha visto que tiene mucho menos efecto que el GSH y sería más rentable convertir el GSSG en GSH mediante la glutathione reductase (Gadea et al., 2013).

Sin embargo, en general se puede valorar que el empleo de antioxidantes como el DHA previo a la congelación, puede revertir de forma efectiva los daños celulares causados por éste, mejorando la calidad del semen tras el proceso de congelación-descongelación como se ha demostrado también en otros estudios (Giaretta et al., 2015).

5. BIBLIOGRAFÍA

- Acker JP, et McGann LE. (2003) "*Protective effect of intracellular ice during freezing?*". Cryobiology, 46: 197-202.
- Almonacid J, et Romero J. (2010) "*Cómo interpretar un seminograma*". FMC, 17(10):681-685.

- Agarwal A, Makker K et Sharma R. (2008) *"Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility"*. Reprod. Immunol., 59(1):2-11.
- Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, et al. (2006) *"Fundamentos de Criopreservación"*. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, 57(4):291-300.
- Barrera LM, Drago ME, Pérez J, Sainz TR, Zamora AC, Gómez F et al. (2004) *"Citometría de Flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica"*. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex., 17(1):42-55.
- Blesbois E, Grasseau I, et Seigneurin F. (2005) *"Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation"*. Reproduction, 129:371-378.
- Chatterjee S, Lamirande E de, et Gagnon C. (2001) *"Cryopreservation Alters Membrane Sulfhydryl Status of Bull Spermatozoa: Protection by Oxidized Glutathione"*. Mol. Reprod. Dev., 60:489-506.
- Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, Gomez-Perez R, Montes H, et al. (2010) *"Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen"*. Invest Clin 51(1):87-99.
- Estevez SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr. et Agarwal A. (2000) *"Improvement in motion characteristic and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swimup processing before freezing"*. Hum. Reprod., 15(10):2173-9.
- Fernández R., Hortas ML, Castilla JA, López M, Valladares JC, Alaminos M, Ruíz A, Castejón FJ, et Sánchez C. (2001) *"Alteraciones de la madurez nuclear en espermatozoides de varones con antecedentes de criptorquidia"*. Cir. Pediatr., 14:95-97.
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, et Ruiz S. (2004) *"Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders"*. Theriogenology, 62(3-4):690-701.
- Gallardo JM. (2007) *"Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal"*. Revista de Investigación Clínica, 49(1):42-47.
- Gialetta E, Estrada E, Bucci D, Spinaci M, Rodríguez-Gil JE, et Yeste M. (2015) *"Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance"*. Theriogenology, 83:399-407.

- Hernández-Matos Y, Delgado L, López R, Martínez G, et Mallok A. (2010) "*Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina*". Revista de Endocrinología y Nutrición, 18(3):153-158.
- Jacob C, Giles GI, Giles NM, et Sies H. (2003) "*Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function*". Angew Chem Int Ed Engl 42:4742-58.
- Kaeoket K, Sang-urai P, Thamniyom A, Chanapiwat P, et Techakumphu M. (2010) "*Effect of Docosahexaenoic Acid on Quality of Cryopreserved Boar Semen in Different Breeds*". Reprod. Dom. Anim., 45:458-463.
- Kutluyer F, Kayim M, Ögretmen F, Büyükleblebici S, et Barbaros P. (2014) "*Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility*". Cryobiology, 69:462-466.
- LeBel CP., Ischiropoulos H, et Bondy SC. (1992) "*Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress*". Chem. Res. Toxicol. 5:227-231.
- Lopes-Santiago BV, Monteiro GA, Bittencourt R, Arduino F, Ovidio PP, et al. (2012) "*Evaluation of Sperm DNA Peroxidation in Fertile and Subfertile Dogs*". Reprod Dom Anim, 47(6):208-209.
- Louis JF, Thoma ME, Sørensen DN, McLain AC, King RB, Sundaram R, et al. (2013) "*The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample*". Andrology, 1:741–748.
- Mallok A, Flores RM, Alonso CA, et Martínez G. (2011) "*Desbalance redox en la infertilidad masculina*". Revista Cubana de Farmacia, 45(2):283,296.
- Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, et Franco JG Jr. (2010) "*Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes*". Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 150(1):42-6.
- Mendiola J, Ten J, Vivero G, Roca M, et Bernabeu R. (2005) "*Esterilidad y Reproducción Asistida: Una perspectiva histórica*". Revista Iberoamericana de Fertilidad, 2(1):15-22.
- Mi Jung E, Hee Lim J, Jin Lee T, Park J-W, Sook Choi K, et Kyu Kwon T. (2005) "*Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

- (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5)". *Carcinogenesis* 26(11):1905-1913.
- Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, et Agarwal A. (2004) "*Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants*". *Fertil Steril*, 82:913–918.
- O'Connell M, McClure N et Lewis SE. (2002) "*The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function*". *Hum. Reprod.*, 17(3):704-9.
- Restrepo Betancur G, Úsuga Suárez A, et Rojano BA. (2013) "*Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino*". *Rev. CES Med. Zootec.* 8(1):115-127.
- Rossato M, Zorzi M, Ferlin A, Garolla A et Foresta C. (2000) "*Effects of cryopreservation on progesterone – induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa*". *Hum. Reprod.*, 15(8):1739-43.
- Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ et Paasch U. (2008) "*Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique*". *J. Androl.* 29:134-142.
- Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA et Stornelli MA. (2005) "*Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal*". *Analecta Vet.*, 25(2):28-35.
- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, et Clark AM. (2009) "*Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis*". *Human Reprod.*, 24(9):2061-2070.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. (1991) "*Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989)*". *Hum Reprod*, 6:811–816.
- Wilding M, Coppola GF, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, et Dale B (2011) "*Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa*". *J Assist Reprod Genet*, 28(3):253-62.
- Woods EJ, Benson JD, Agca y, Critser JK. (2004) "*Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues*". *Cryobiology*, 48:146-56.

ANEXO I. Autorización del comité de bioética.

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA Y DESARROLLO RURAL
Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera

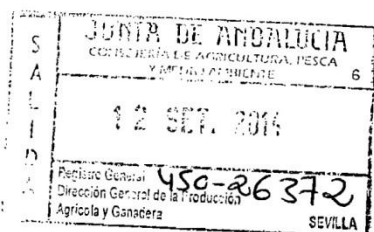
Fecha: 10 de septiembre de 2014

Ref.: SSA/SI/MD/ps

Asunto: Rem. Resolución
experimentación

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Servicio Central de Experimentación y
Producción Animal
A la at. D^a. Raquel Hernández Cobo
Campus Las Lagunillas s/n
23071JAÉN

Se adjunta Resolución de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, por la que se autoriza a D^a. Raquel Hernández Cobo, un proyecto de experimentación animal denominado: "Bases biológicas de la reproducción humana (Grado de Biología)".



C/ Tabladilla, s/n
Teléfono 955 03 20 00
41071 - Sevilla

**RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y GANADERA,
POR LA QUE SE AUTORIZA A D^a. RAQUEL HERNÁNDEZ COBO, UN PROYECTO DE
EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

Examinada la solicitud de autorización de D^a. Raquel Hernández Cobo, con D.N.I.26012989N, para la realización de un proyecto de experimentación animal, se han apreciado los siguientes

ANTECEDENTES DE HECHO

Primero. Con fecha 30 de julio de 2014, D^a. Raquel Hernández Cobo, en su condición de responsable del proyecto, presentó solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación: "Bases biológicas de la reproducción humana (Grado en Biología)"

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el informe del Comité Ético, resumen no técnico e informe de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo. La documentación aportada acredita que la interesada, tiene la titulación y formación específica para desarrollar proyectos experimentales con animales y cuenta con la capacitación específica para ello.

Tercero. El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como centro usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número ES230500000020.

Cuarto. Con fecha 17 de julio de 2014, el Comité de Ética del centro emiten un informe de evaluación favorable, conforme al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Quinto. Con fecha 28 de julio de 2014, El Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Jaén, órgano habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el procedimiento cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero. El artículo 3.2 del Decreto 133/2005, de 24 de mayo, por el que se regula la distribución de las competencias establecidas en la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de protección de los animales, entre las Consejerías de Gobernación y de Agricultura y Pesca, dispone que corresponde a la segunda "la autorización previa de toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte, prevista en el artículo 7.2 de la Ley".

Por su parte, artículo 13 del Decreto 141/2013, de 1 de octubre, por el que se establece la estructura orgánica de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural prevé:

“Corresponde a la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, además de las funciones establecidas en el artículo 30 de la Ley 9/2007, de 22 de octubre, las siguientes:

i) La ordenación y fomento de la protección y del bienestar animal”.

Segundo. El artículo 7.2 de la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, manifiesta que “toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte requerirá autorización previa de la Consejería competente por razón de la materia y supervisión veterinaria”.

Por su parte, el artículo 25 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, dispone:

“2. Los procedimientos solo se podrán realizar si están incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado de acuerdo con la sección 2ª de este capítulo.

3. Los procedimientos deberán realizarse de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

4. Los procedimientos se realizarán en centros usuarios autorizados, salvo autorización del órgano competente, previa justificación científica de la necesidad o conveniencia de que se realicen fuera de dichos centros.

5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable”.

Asimismo, el artículo 31 del citado Real Decreto, situado en su sección 2ª, regula la tipología de proyectos con arreglo a la siguiente clasificación:

“1. Proyectos de tipo I: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos de tipo II: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».

b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: Los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva”.

Tercero. El artículo 3.1 f) del RD/53/2013, de 1 de febrero: “no se considera procedimiento la eutanasia de los animales cuando se realiza con el único fin de utilizar sus órganos o tejidos”.

Cuarto. El artículo 19.1 del Decreto 65/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales establece:

“Todos los establecimientos cuyo objeto sea la producción, comercialización o uso de animales con fines experimentales, científicos o educativos ubicados en la Comunidad Autónoma de Andalucía, previo al inicio de la actividad, de conformidad con lo establecido en el artículo 7 de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, deberán inscribirse en el Registro Único de Ganadería de Andalucía, en la sección de Explotaciones Ganaderas de Andalucía, de conformidad con el artículo 33 y deberán contar para su inscripción con la autorización prevista en el artículo 36.1 de la Ley 8/2003, de 24 de abril”.

Quinto. El proyecto para el que se solicita la autorización no se puede clasificar en el ámbito del RD 53/2013 de 1 de febrero, porque no incluye ningún procedimiento de los tipos, leve, moderado, severo y sin recuperación. Además, el centro donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización y la persona encargada de la realización de las prácticas docentes tiene capacitación para ello. A ello se le une el carácter favorable los informes emitidos al respecto, por lo que cumpliendo con los requisitos previstos ha de procederse a su autorización y no debe someterse a evaluación retrospectiva.

En consecuencia, de conformidad con los preceptos citados y demás de general aplicación.

RESUELVO

Primero. Autorizar a, D^a. Raquel Hernández Cobo, el proyecto denominado: “Bases biológicas de la reproducción humana (Grado en Biología)”, durante 1 año.

Segundo. Ordenar la notificación de la presente Resolución a la persona interesada, con indicación de que contra la misma, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponer recurso de alzada ante la persona titular de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, en el plazo de un mes contado a partir del día siguiente al de la notificación, según lo previsto por los artículos 114 y 115 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común.

En Sevilla a 5 de septiembre de 2014
EL DIRECTOR GENERAL DE LA PRODUCCIÓN

