



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis in vitro de espermatozoides tras exposición a herbicida y nicotina. Efecto antioxidante y protector de la melatonina

Alumno: Antonio Cruz Campos

Junio, 2022



Trabajo fin de grado

Análisis in vitro de espermatozoides tras exposición a herbicida y nicotina. Efecto antioxidante y protector de la melatonina

Una firma manuscrita en tinta negra que dice "Antonio". La letra "A" es muy grande y se extiende hacia la izquierda, mientras que el resto de la palabra "ntonio" es más compacta y se extiende hacia la derecha.

Alumno: Antonio Cruz Campos

Jaén, junio 2022

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Infertilidad y el factor masculino	2
2.2. Espermatozoide y plasma seminal.....	3
2.3. Antecedentes sobre el glifosato	4
2.3.1. Efectos del glifosato en el esperma	5
2.4. Antecedentes de la nicotina	6
2.4.1. Efectos de la nicotina en el esperma	6
2.5. Antioxidantes y melatonina.....	7
2.5.1. Posibles efectos antioxidantes de la melatonina en el esperma.....	8
2.6. Parámetros a estudiar.	9
2.6.1. Vitalidad espermática.....	9
2.6.2. Daño en la membrana espermática y fertilidad.....	10
2.6.3. Espermatozoides apoptóticos.....	10
2.6.4. Fragmentación del ADN.....	11
2.6.5. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	12
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL Y MÉTODOS	13
4.1. Obtención de la muestra	13
4.2. Preparación de reactivos.....	13
4.3. Diseño experimental.....	14
4.4. Preparación de la muestra para los siguientes protocolos	14
4.5. Análisis microscópico	15
4.6. Análisis mediante citómetro de flujo	15
4.6.1. Evaluación del grado de apoptosis	15
4.6.2. Evaluación de daño de membrana con merocianina	16
4.6.3 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).	16

4.7. Fragmentación de ADN	16
4.8. Análisis estadísticos.	17
5.RESULTADOS.	18
5.1. Resultados vitalidad espermática.	18
5.2. Resultados grado de apoptosis	21
5.3. Resultados especies reactivas de oxígeno (ROS)	25
5.4. Resultados de daño de membrana con merocianina	30
5.5. Resultados de fragmentación de ADN	35
6.DISCUSIÓN.....	36
7.CONCLUSIÓN.....	39
8.BIBLIOGRAFÍA.....	39

1.RESUMEN/ABSTRACT

El glifosato, herbicida más utilizado en el mundo en la agricultura y la nicotina, uno de los componentes principales del tabaco, se han vuelto preocupantes para la salud reproductiva de la humanidad. Este trabajo tiene como objetivo comprobar el efecto de estos dos componentes en el espermatozoide porcino y los posibles efectos protectores de un antioxidante, la melatonina. Para ello las muestras seminales se dividieron en 6 grupos experimentales. En las alícuotas se analizaron diferentes variables: vitalidad, apoptosis espermática, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daños de membrana y fragmentación de ADN. Los resultados mostraron un aumento de la mortalidad, un mayor número de especies reactivas de oxígeno y apoptosis, por ambas sustancias dañinas para nuestro organismo. También se observó que aumentaban los daños de membrana, así como daños en el ADN, ambas solo por el glifosato. Por último, la melatonina ejerció un gran poder protector frente al glifosato en cuanto a la vitalidad y la apoptosis espermática, en los demás no se observó una mejora significativa.

Palabras clave: Glifosato, melatonina, nicotina, antioxidante, espermatozoide.

Glyphosate, the most widely used herbicide in agriculture in the world, and nicotine, one of the main components of tobacco, have become a concern for the reproductive health of humanity. The objective of this work is to verify the effect of these two components in pig sperm and the possible protective effects of an antioxidant, melatonin. For this, the seminal samples were divided into 6 experimental groups. Different variables were analysed in the aliquots: vitality, sperm apoptosis, generation of reactive oxygen species (ROS), membrane damage and DNA fragmentation. The results showed an increase in mortality, a greater number of reactive oxygen species and apoptosis, due to both substances that are harmful to our body. Membrane damage, as well as DNA damage, were also observed to be increased, both by glyphosate alone. Finally, melatonin exerted a great protective power against glyphosate in terms of sperm vitality and apoptosis, in the others no significant improvement was observed.

Key words: Glyphosate, melatonin, nicotine, antioxidant, sperm.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Infertilidad y el factor masculino

La infertilidad es un trastorno complejo, heterogéneo y afectado por un enorme número de factores biológicos, con los años se ha visto incrementada la demanda de atención sanitaria al respecto. No debemos confundir la infertilidad con esterilidad, la infertilidad es la incapacidad para concebir y la esterilidad es la incapacidad para fecundar. También, cabe destacar que, la infertilidad primaria es que la pareja, tras un año de relaciones sexuales, sin medida anticonceptiva alguna, no ha obtenido un embarazo y la infertilidad secundaria, en cambio, es que la pareja si ha podido obtener un embarazo, pero no hay posibilidad de un segundo. Hay un porcentaje de causas desconocidas de infertilidad y este tipo se denomina idiopática.

Según la OMS afecta alrededor del 15-20% de las parejas, dentro de la edad reproductiva, siendo aproximadamente un 50% del total, en varones y un 20% la combinación de alguna patología en ambos miembros de la pareja (Approaches, 2012). Los continentes donde se advierten las mayores tasas de infertilidad son Europa central y oriental y América, tanto norte américa como Latinoamérica (Agarwal et al., 2015).

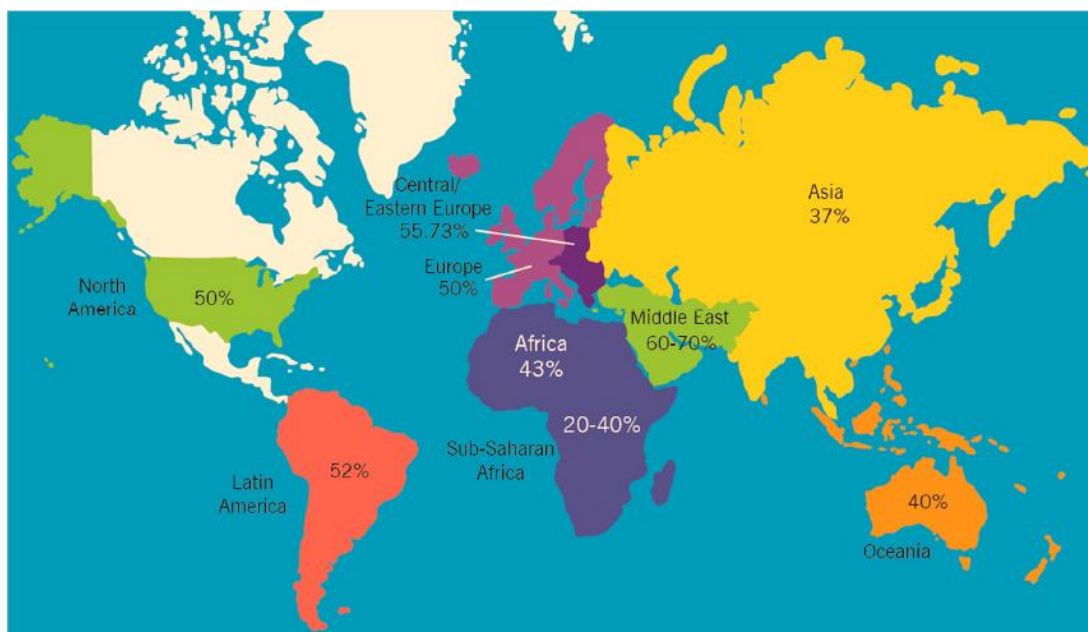


Figura 2.1: Mapa mundial con los porcentajes en casos de infertilidad atribuidos al factor masculino (Agarwal et al., 2015).

Los factores ambientales han sido y serán relacionados con un alto riesgo en la infertilidad, tanto femenina, como masculina, ya que se sabe que la normal funcionalidad reproductiva, se ve alterada por agentes físicos y químicos, presentes en el medio ambiente, utilizados en nuestras actividades del día a día, producción industrial o agrícola, etc. (Oliva et al., 2001).

Más recientemente, se ha formulado al factor genético como la causa de alrededor del 15% de los casos de infertilidad masculina del total, sobre esto todavía hay un enorme desconocimiento, pero se han conseguido identificar algunos determinantes genéticos como alteraciones cromosómicas (autosómicos y sexuales), microdeleciones del cromosoma Y, fragmentación del ADN espermático (Huynh et al., 2002).

La razón de una espermatogénesis y una función deficiente se pueden corresponder con varias causas: a nivel pretesticular (hipogonadismo o hipogonadismo hipogonadotrópico, síndrome de Kallman, entre otros), testicular (varicocele, cáncer testicular) o posttesticular (Krausz, 2011).

2.2. Espermatozoide y plasma seminal

Es la célula sexual masculina, con una especialización alta, cuya función es la fecundación del ovulo, su proceso de formación se denomina espermatogénesis y este tiene lugar en los testículos. Consta de tres partes: cabeza, pieza intermedia y cola.

La cabeza (4 a 5 μm x 2 a 3 μm) formada por: el acrosoma, el núcleo y la membrana plasmática envolviendo. La zona intermedia, con un gran número de mitocondrias en disposición helicoidal y los centriolos. Por último, la cola o flagelo (aproximadamente 50 μm de longitud), permite el movimiento celular. Cualquier alteración en alguna de estas tres partes, puede desencadenar problemas de infertilidad (Carlson, 2000).

El plasma seminal es una mezcla de secreciones generadas en los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias. Está implicado en una gran cantidad de funciones y acontecimientos de los espermatozoides que anteceden a la fertilización (Kareskoski y Katila, 2008). No solo es un simple medio de transporte para los espermatozoides, sino que también funciona como un regulador del ambiente del tracto femenino, facilitando un sitio óptimo para el desarrollo del embrión y con esto favorece la salud de la futura descendencia (Bromfield, 2014).

En la eyaculación el espermatozoide se junta con el líquido seminal, fluido constituido por las segregaciones de las vesículas seminales (ricas en fructosa, sustancia energética para el espermatozoide, aminoácidos y prostaglandinas, que actúan como bactericidas) y de

la próstata (fluido rico en ácido cítrico, fosfatasa ácida, ácido ascórbico, zinc e iones de magnesio), valores de normalidad son de 2 a 6 ml (Carlson, 2000).

2.3. Antecedentes sobre el glifosato

El glifosato N-(fosfonometil) glicina, afecta de manera tanto directa, afectando a la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) inhibiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos vitales para la planta, como indirecta, incidiendo a la fisiología de la planta, decreciendo los niveles de clorofila, provocando un estrés oxidativo, disminuyendo el rendimiento fotosintético, etc. (Gomes et al., 2014).

Se ha convertido en el herbicida más usado en el mundo, debido a diversos factores, no es selectivo, por lo tanto, tiene un gran rango de actuación y por el ingreso en la población de plantas con resistencia al glifosato en 1996, debido al estudio e investigación con transgénicos (O Duke y B Powles, 2008). Más de 8,6 mil millones de kilogramos de glifosato han sido empleados en todo el mundo desde la década de 1970 (Müller, 2021).

La manera más común de exposición al glifosato, así como a otros herbicidas es en la dieta o mediante contacto directo en las grandes fumigaciones al aire libre. (Anifandis et al., 2017). Además, puede contaminar el agua de zonas cercanas a los cultivos y el suelo que, por infiltración, puede llegar a los acuíferos (Gomes et al., 2014).

Los residuos de glifosato y su producto de degradación, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), además de una gran relación significativa con enfermedades humanas, también afecta al medio ambiente, a sus componentes bióticos y abióticos (Van Bruggen et al., 2018). Afectando de manera negativa a las comunidades bacterianas del suelo (Arango et al., 2014), especies acuáticas de microalgas, bacterias y protozoos (Tsui y Chu, 2003) e incluso microorganismos en animales, ocasionando enfermedades en los huéspedes (Clair et al., 2012).

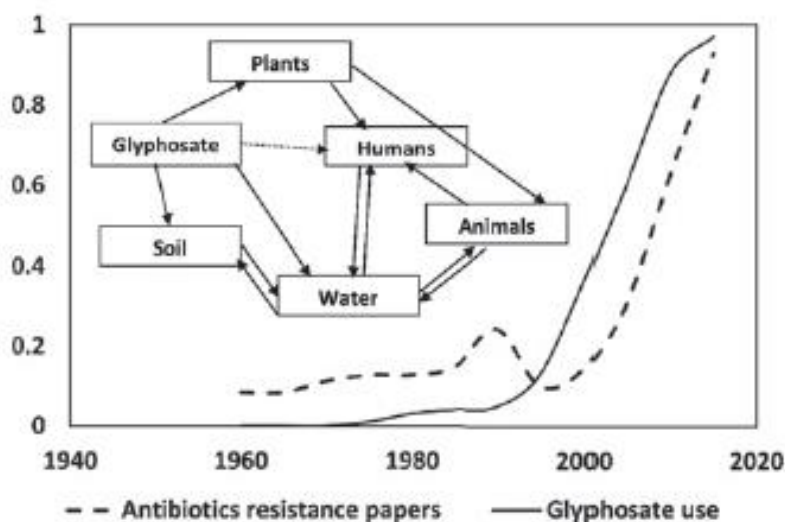


Figura 2.2: relación del glifosato con los factores abióticos y bióticos del medio (Van Bruggen et al., 2018).

2.3.1. Efectos del glifosato en el esperma

Además de la toxicidad tan amplia que ejerce el glifosato en el medio y en sus habitantes, se baraja en diversas investigaciones el papel del glifosato en el rendimiento reproductivo, tanto es así que, si observamos el índice de publicaciones, este aumenta con los años, siendo, por tanto, una preocupación mundial creciente.

En esperma porcino, se evaluó la viabilidad, la actividad de las mitocondrias, motilidad y la integridad del acrosoma en esperma tratado con glifosato, teniendo efecto perjudicial solo en dosis altas, en bajas concentraciones, no se vieron efectos significativos (Nerozzi et al., 2020).

En cobayas tratadas con este herbicida, se vieron claras disminuciones en el peso de las gónadas, conductos gonadales, así como los parámetros de vitalidad y motilidad, hubo un aumento de anomalías morfológicas (Mutwedu et al., 2021).

La exposición directa de glifosato en ratas, tuvo un efecto negativo en la calidad del esperma, aumentando la cantidad de esperma muerto, bajaron a su vez la motilidad, los niveles de testosterona y el peso del epidídimo (Abarikwu et al., 2015).

En ratonas preñadas tratadas con glifosato, siendo una exposición perinatal y después postparto fue tratada la descendencia, se vieron efectos negativos en la espermatogénesis, a nivel del conteo, motilidad, morfología y el tamaño de la camada también se vio afectado (Pham et al., 2019).

En humanos, in vitro, se vieron efectos negativos del glifosato en la motilidad espermática, la cual representa un papel muy importante en la fertilidad, pero no se vieron efectos significativos en la integridad del ADN (Anifandis et al., 2018). Además,

se observó una disminución significativa en la funcionalidad mitocondrial (Anifandis et al., 2017), este decrecimiento en la funcionalidad se relacionó con una menor eficiencia respiratoria, lo que explicaría una menor motilidad, al haber menor cantidad de energía, el efecto se observa incluso a bajas dosis (Ferramosca et al., 2021). Incluso al glifosato se le atribuye, la herencia de enfermedades transgeneracionales, por la epigenética que sufre al estar expuesto por este agente tóxico (Ben Maamar et al., 2021).

2.4. Antecedentes de la nicotina

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) hay 1330 millones de fumadores en el mundo, datos de la BBC los fijan en 1140 millones, en ambos casos hablamos de una enorme cantidad de nicotina, con los problemas de adicción y otros que presentan. Siendo este consumo exagerado, cada vez una preocupación mayor.

Las consecuencias para la salud del tabaquismo y del uso de otros productos del tabaco son muy conocidas. Son motivo del incremento de la mortalidad y la morbilidad en los países desarrollados y aumentando también en el mundo en desarrollo (Kapoor & Jones, 2005; Oyeyipo et al., 2011).

El humo del cigarro, así como el cigarrillo en sí, contiene una gran cantidad de compuestos, alrededor de unos 4000 compuestos químicos (Condorelli et al., 2013), entre ellos se encuentran los alcaloides, cuyo mayor representante en este grupo es la nicotina (Oyeyipo et al., 2011). Es difícil conocer los efectos directos o indirectos de la nicotina, debido al gran número de componentes nocivos que presenta el tabaco (Cme, 2014).

La nicotina es una sustancia adictiva que se encuentra en los cigarrillos, el tabaco sin humo, la pipa de agua, los cigarrillos electrónicos y la terapia para dejar de fumar (Cme, 2014). La nicotina utilizada en los parches para dejar de fumar es comparable a 16 cigarrillos y aun así se ha utilizado ampliamente (Budin et al., 2017).

2.4.1. Efectos de la nicotina en el esperma

Si observamos en bases de datos como “Pubmed” o “Google Scholar”, vemos un aumento de publicaciones relacionadas con estudios que relacionan a la nicotina como un factor limitante o que altera la fertilidad.

Se vieron efectos adversos de la nicotina en el esperma de rata, en la motilidad espermática de manera significativa e incluso en el recuento, aumenta el número de anomalías, así como una disminución en la camada y de la libido en machos tratados

(Oyeyipo et al., 2011), incluso la exposición a este componente del tabaco, ocasionó un efecto nocivo en los testículos y próstata de ratas (Budin et al., 2017).

En ratas expuestas durante el embarazo también se vieron efectos adversos similares en la descendencia (Miranda-Spooner et al., 2016). Los efectos en testículos incidieron en la espermatogénesis, disminuyendo su eficiencia (Aydos et al., 2001).

Un estudio reciente en ratas, relacionó de manera significativa a la nicotina, como la responsable de la metilación de genes en los espermatozoides, encargados del desarrollo, más concreto en el neuronal (Schrott et al., 2020).

En humanos, in vitro, se vieron efectos nocivos de la nicotina en la fertilidad, afectando incluso a bajas concentraciones de manera significativa a la viabilidad y a la motilidad, incluso a la fragmentación del ADN espermático, aumentando la cantidad de espermatozoides con alteraciones en la cromatina (Condorelli et al., 2013). También, se observa un aumento de especies reactivas de oxígeno en fracciones espermáticas expuestas a este compuesto alcaloide (Saleh et al., 2002).

2.5. Antioxidantes y melatonina

Un antioxidante es una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas. Es decir, que, a concentraciones bajas, es capaz de inhibir o retrasar la oxidación de un sustrato oxidable. Diversos alimentos y sustancias generadas por el propio organismo tienen capacidad antioxidante (Gülçin, 2012).

Definimos como oxidación a la transferencia de electrones de un átomo a otro, es algo vital en nuestro metabolismo, siendo, el último en captar los electrones en el sistema, el oxígeno, para generar ATP (Davies, 1995; Gülçin, 2012). Pero, suceden complicaciones si ese flujo se desequilibra, generando radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (Gülçin, 2012).

La melatonina es producida por diversos organismos como bacterias, protozoos, algas, hongos, otras plantas, invertebrados y más recientemente se descubrió que es sintetizada por la glándula pineal, presente en la mayoría de vertebrados, incluido el hombre (Hardeland et al., 2006).

La glándula pineal y la síntesis de dicha hormona, no está mediada por la presencia o no de otras hormonas o el correcto funcionamiento de otras glándulas, su regulación en la producción es por la presencia o ausencia de luz, por lo tanto, un aumento de la producción irá de la mano de la ausencia de luz y del sueño, teniendo el pico álgido de producción durante la noche (Reiter, 2003). La melatonina, generada por la

glándula pineal es solo una parte de la total, también puede sintetizarse en varios tejidos extra pineales (Cebrián-Pérez et al., 2014).

La melatonina tiene diversos efectos beneficiosos en nuestro organismo, funciones antitumorales, inmunológicas, regulación de ciclos circadianos y antioxidantes (Reiter, 2003). La gran cualidad de suprimir radicales libres por parte de la melatonina, se observó en 1933, tiene un efecto antioxidante mucho más potente que la vitamina C o E (Tan et al., 2005).

2.5.1. Posibles efectos antioxidantes de la melatonina en el esperma

Cabe destacar que en el líquido seminal hay una pequeña cantidad de melatonina, su cantidad es muy pequeña, hablamos de nanomolar (Ortiz et al., 2011), esto es un buen dato, ya que da que pensar que la melatonina tiene alguna función dentro del esperma o la reproducción.

Además, viendo la capacidad antioxidante que tiene la melatonina para la salud, podríamos pensar que este efecto protector es igual a nivel espermático, por eso crece el número de publicaciones acerca de este compuesto y su relación con la fertilidad.

Frente a un pesticida como es el Diazinon, un pretratamiento con melatonina previno el efecto tóxico a nivel de daños en el ADN provocados por dicho compuesto, en esperma de ratón (Sarabia et al., 2009).

Se ha utilizado la melatonina en el ganado ovino, para aumentar el ciclo estral en las hembras y para aumentar la libido en machos, así como la calidad espermática (Cebrián-Pérez et al., 2014).

El tratamiento con melatonina en esperma de toro, redujo la externalización de la fosfatidilserina, la integridad del acrosoma y las especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto reduce la presencia de espermatozoides apoptóticos (Li et al., 2019).

Se verificó, en humanos, que la melatonina puede disminuir el daño oxidativo ejercido por el calor en el esperma, disminuyendo las ROS y la apoptosis espermática, aumentó la integridad de membrana e incluso incrementó la motilidad, teniendo por tanto un gran efecto antioxidante (Zhao et al., 2021).

En la criopreservación de espermatozoides, se estudió el papel de la melatonina como antioxidante, obteniendo resultados satisfactorios y provocó una disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumentó la viabilidad y la motilidad (Karimfar et al., 2015).

En un estudio con donantes infértiles, se incubó el esperma con melatonina, para ver el efecto de este antioxidante, mejorando la motilidad y la progresividad del esperma

en tiempos cortos, las morfologías normales aumentaron significativamente también. Indicando que la melatonina como suplemento podría ser un tratamiento para mejorar casos de infertilidad (Ortiz et al., 2011). También, inhibió de manera significativa la tasa de peroxidación lipídica (Gavella y Lipovac, 2000).

2.6. Parámetros a estudiar.

2.6.1. Vitalidad espermática

El análisis de semen básico consta de varias partes, entre ellas, la valoración de la vitalidad espermática. Cuando el espermatozoide presenta baja motilidad, es mucho más aconsejable, para demostrar si en esa proporción de espermatozoides inmóviles hay células vivas o muertas (Mortimer, 2020).

En los laboratorios de andrología clínica, los métodos más usados son dos, se basan en exclusión de algún colorante vital o la capacidad de regulación osmótica en condiciones de menor presión osmótica. Estos métodos son la tinción con eosina-nigrosina o la prueba de hinchazón hipoosmótica (Moskovtsev y Librach, 2013; OMS, 2001).

La tinción con eosina-nigrosina, la cual se desarrolló para uso en mamíferos en 1950, normalizándose luego su utilización en espermatozoides humanos (Björndahl et al., 2003), es la técnica más utilizada y que utilizaremos en nuestro estudio, los espermatozoides que se tiñen de un color rosa o rojizo se encuentran muertos y esto es así porque tienen la membrana dañada y el colorante entra en el interior.

En cambio, los espermatozoides que no se tiñen, la membrana no tendrá daños y estos se encontrarán vivos. El límite inferior de referencia es del 58 %, por debajo de ese porcentaje, se tratará ese espermatozoide como infértil.



Figura 2.3: Esquema modelo sobre los posibles resultados en la tinción de eosina-nigrosina.

2.6.2. Daño en la membrana espermática y fertilidad

La membrana plasmática en el espermatozoide es una estructura muy importante con función protectora. Además, es vital en la capacitación espermática y la fertilización. Su composición, mayoritariamente por glicerofosfolípidos, la cantidad y el tipo de estos está muy relacionado con la calidad, siendo de mayor calidad, cuando predominan ácidos grasos poliinsaturados (Tapia et al., 2012).

Estas cadenas de acilo altamente insaturadas confieren gran fluidez a la membrana espermática y, por tanto, mayor elasticidad para resistir cambios de volumen. Sin embargo, esto hace que los espermatozoides sean particularmente vulnerables al ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo mucho más susceptibles a experimentar la peroxidación lipídica (Wathes et al., 2007).

En mamíferos, por ejemplo, los ciclos de congelación y descongelación ocasionan deshidratación celular, generando un estrés osmótico y con esto un daño de membrana espermática. Estas alteraciones preceden rápidamente en la pérdida de la arquitectura de los orgánulos y alteraciones en el plasma, incrementando la generación de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica (Tapia et al., 2012).

2.6.3. Espermatozoides apoptóticos

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada de manera que genéticamente inducen un número de perturbaciones celulares, morfológicas y bioquímicas, guiando al suicidio celular sin una reacción inflamatoria. Los indicadores de apoptosis son: presencia de fosfatidilserina en la membrana externa, activación de caspasas, menor potencial de membrana mitocondrial y fragmentación del ADN (Aziz et al., 2007).

En un estudio en humanos, vieron que dichos marcadores, están relacionados de manera negativa con la posibilidad de penetración del óvulo, disminuyendo esta probabilidad a medida que aumentan los marcadores. Conociendo esto se pueden desechar esos espermatozoides, que bajan la probabilidad de éxito en técnicas de inseminación artificial (Grunewald et al., 2007). Se relacionó los niveles altos de ROS intracelulares, con la apoptosis de espermatozoides (Mahfouz et al., 2010).

Hay diferencias claras en la morfología de espermatozoides no apoptóticos, con una calidad superior, con los apoptóticos, encontrando en estos, daños en el acrosoma, alteraciones en la pieza intermedia y gotas citoplasmáticas (Aziz et al., 2007).

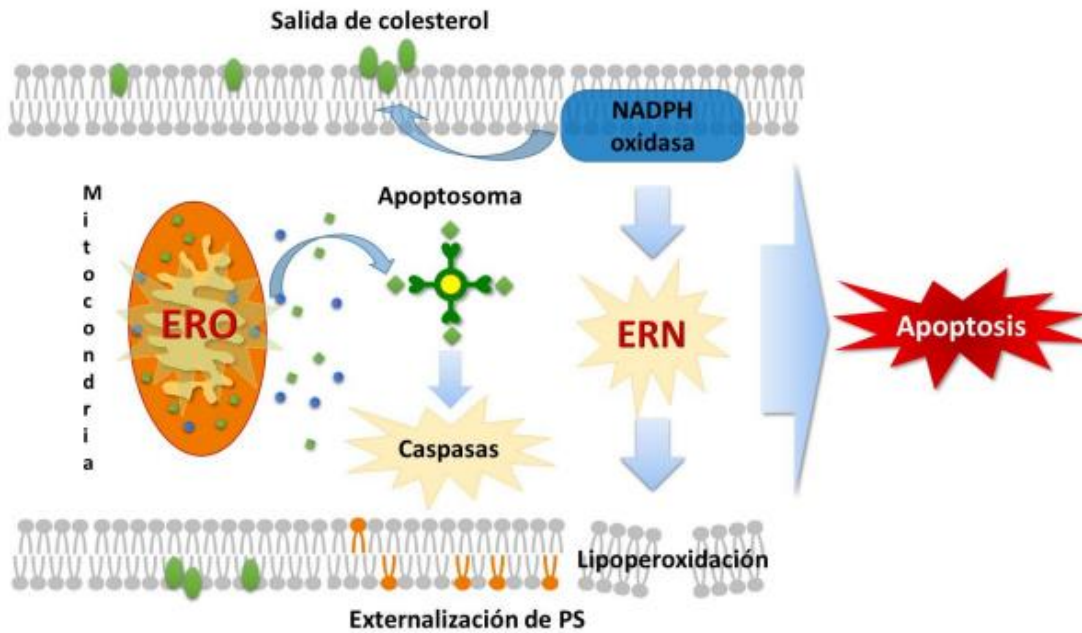


Figura 2.4: Proceso de apoptosis en espermatozoides (López-Trinidad et al., 2016).

2.6.4. Fragmentación del ADN

Un aspecto importante a considerar cuando se selecciona espermatozoides de manera no natural, en procesos de inseminación artificial, es la condensación de la cromatina, su calidad, ya que es un factor limitante en la fertilidad (Golan et al., 1997). La integridad del ADN de los espermatozoides es fundamental para la transmisión precisa de la información genética paterna (Mahfouz et al., 2009).

Entre los casos de infertilidad masculina, sobre un 15% presentan un análisis espermático normal, por esto, se siguen buscando análisis para aumentar el conocimiento, diagnóstico y tratamiento de la infertilidad. Los espermatozoides sufren selección natural, por lo tanto, no fertilizan el ovulo, espermatozoides con anomalías, las técnicas de reproducción asistida no evitan dicha selección (Shafik et al., 2006).

En el espermatozoides, el ADN se encuentra muy compacto, con una estructura compleja, la capacidad de transmisión correcta de la información genética, así como la fertilidad de este dependen mucho de la integridad del ADN (Mahfouz et al., 2009). A medida que el porcentaje de espermatozoides con daños en el ADN aumenta, bajan las probabilidades de éxito en la reproducción tanto natural, como en los tratamientos de reproducción asistida y en el caso que ocurra, los riesgos de anomalías en el desarrollo embrionario aumentan (Agarwal y Said, 2003).

El material genómico puede presentar diferentes anomalías, así como fragmentación del ADN, aneuploidías, mal empaquetamiento, inmadurez nuclear o en la integridad

del ADN. Las causas son varias, los hábitos de vida no saludables, altas temperaturas testiculares, el efecto ambiental, edad avanzada, el papel genético y un exceso de especies reactivas de oxígeno (Rodríguez Pendás, 2017).

2.6.5. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los espermatozoides, debido al poco espacio en su citoplasma y la incapacidad de albergar un número grande de enzimas protectoras, son muy sensibles a los daños oxidativos, además se este efecto dañino se ve aumentado, ya que las mismas células producen especies reactivas de oxígeno, relacionado este proceso con la capacitación espermática (Aitken y Baker, 2016).

Un reducido número de especies reactivas de oxígeno (ROS), son necesarias para la función precisa del espermatozoide, entre ellas la capacitación e hiperactivación espermática y la reacción acrosómica. Pero una cantidad alta de estas, es sinónimo de infertilidad (Barati et al., 2020).

El estrés oxidativo genera un enorme número de especies reactivas de oxígeno (ROS), disminuyendo la calidad del espermatozoide al dañar el ADN del espermatozoide y arriesga la homeostasis intracelular en el espermatozoide (Zhao et al., 2021).

Además, afecta a la inactivación enzimática, oxidando proteínas vitales para los espermatozoides. Este estrés oxidativo del que hablamos se debe a varios motivos, siendo la principal el estilo de vida y como secundarios los procesos inflamatorios, mutaciones, niveles hormonales descontrolados o la presencia de espermatozoides inmaduros (Barati et al., 2020).

En las técnicas de reproducción asistida, es crucial evitar la presencia de un excesivo número de especies reactivas de oxígeno, ya que generan un ataque a los espermatozoides (Zhao et al., 2021).

Los daños oxidativos, como un elevado número de especies reactivas de oxígeno, también se relacionan con la apoptosis espermática (Aitken y Baker, 2016).

3. OBJETIVOS

Como objetivo general es analizar el efecto del herbicida y el efecto reparador frente a este, que pueden ejercer los antioxidantes en muestras espermáticas in vitro

Con este trabajo experimental también se quieren cumplir otros objetivos secundarios:

1. Observar el efecto del glifosato en el esperma, observando los datos obtenidos de vitalidad, especies reactivas de oxígeno, daño de membrana, apoptosis y fragmentación del ADN
2. Observar el efecto de la nicotina en el esperma observando los datos de vitalidad, especies reactivas de oxígeno, daño de membrana, apoptosis y fragmentación del ADN.
3. También ver si tienen una acción sinérgica, la mezcla de dos reactivos, comunes en nuestro entorno, como son el glifosato y la nicotina, en la fracción espermática
4. Analizar si el efecto de un antioxidante verificado como es la melatonina, es capaz de revertir posibles daños frente al glifosato.
5. Por último, ver si la melatonina tiene un efecto tóxico o no en la fracción espermática, para su posible utilización en tratamientos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Obtención de la muestra

Este estudio se ha llevado a cabo con muestras de semen porcino proporcionadas por Semen Cardona S.L, empresa internacional, centrada en la elaboración y distribución de dosis para inseminación artificial porcina de alto rendimiento.

4.2. Preparación de reactivos

El herbicida, glifosato, se preparó a una concentración de 0,36 mg/L, para la melatonina se preparó a una concentración de 232 mg/L, ambos reactivos se diluyeron en PBS.

La merocianina 540 (M540) en cambio se disuelve en etanol al 50% y la prepararemos a una concentración final de 0,034 M, para preparar el dicloro, 2'-7' diclorodihidrofluoresceindiacetato (H2DCFDA), buscamos la misma concentración final, pero en este caso se diluye en PBS.

Por último, el 4',6 Diamidino 2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), el cual se prepara una dilución 1:500 en PBS. La casa comercial de todos los reactivos es Sigma-aldrich, Madrid. España.

4.3. Diseño experimental

Se dividió en 6 grupos:

-Grupo control: muestra de esperma en PBS.

-Grupo 1: Tratamiento con glifosato.

-Grupo 2: Tratamiento con nicotina.

-Grupo 3: Tratamiento con melatonina.

-Grupo 4: Tratamiento con glifosato y nicotina.

-Grupo 5: Tratamiento con glifosato y melatonina.

Tabla 4.1: volúmenes de muestra y los distintos reactivos utilizados en cada uno de los grupos experimentales y en cada uno de los protocolos (los espacios donde no aparece nada, corresponden a la ausencia de esa sustancia en dicho grupo).

	Muestra	PBS	Glifosato	Melatonina	Nicotina
Control	3 ml	3 ml			
Grupo 1	3 ml	1,5 ml	1,5 ml		
Grupo 2	3 ml	3 ml			100 µL
Grupo 3	3 ml	1,5 ml		1,5 ml	
Grupo 4	3 ml	1,5 ml	1,5 ml		100 µL
Grupo 5	3 ml		1,5 ml	1,5 ml	

4.4. Preparación de la muestra para los siguientes protocolos

Antes de realizar cualquier protocolo, la muestra debe estar libre de cualquier reactivo de incubación, para ello se realiza lo siguiente:

Una vez introducidos los reactivos respectivos a cada grupo en tubos de ensayo falcon, en los grupos 3 y 5 la melatonina la introducimos en primer lugar, los incubamos a 35 grados. Para ir sacando las alícuotas de incubación, tendremos tubos eppendorf de 1,5 ml.

Las mediciones las haremos cada 30 minutos, hasta llegar a los 90, por lo tanto, se harán 3 mediciones de cada uno de los grupos, dos réplicas de cada grupo en cada medición, sacando en cada medición 2 alícuotas de cada grupo. Cada alícuota es de 1 ml. Una vez esto, se llevarán las muestras a la centrifuga, a 10000 revoluciones, durante 5 minutos y desechamos el sobrenadante quedándonos con el pellet.

Después de esto resuspendemos en 1 ml de PBS, quedando las alícuotas listas para cualquier tipo de análisis posterior y libres de otras sustancias que pueden distorsionar los datos.

4.5. Análisis microscópico

La vitalidad espermática se evaluó mediante el método de tinción con eosina-nigrosina, el protocolo de tinción fue el siguiente:

En un tubo eppendorf añadimos 50 μ l de eosina-nigrosina y 50 μ l de muestra, en concentración 1:1, así con todos los grupos. Paso siguiente, se realiza un frotis.

Finalmente colocaremos una gota de medio de montaje, cubrir con un cubreobjetos y observar al microscopio, con el objetivo x40 será suficiente. Al menos 200 espermatozoides, por cada portaobjetos fueron evaluados y los resultados se expresan en porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

4.6. Análisis mediante citómetro de flujo

Esta tecnología proporciona un análisis multiparamétrico o purificación rápida de células individuales en solución, apoyándose en sus propiedades de dispersión de luz o fluorescencia. Para ello utilizan láseres como fuentes de luz, las cuales son leídas por detectores. Luego son analizadas por un ordenador. Es una herramienta poderosa que tiene aplicaciones en múltiples disciplinas (Villas, 1998).

Debido al desconocimiento de muchos casos de infertilidad, su desarrollo está permitiendo abrir nuevos rumbos hacia el conocimiento acerca de pruebas diagnóstico, causas y posibles tratamientos de infertilidad. Con enfoques tan potentes, no solo se quedan en los avances médicos, también en la industria animal, mejora en la calidad de las dosis y con él la rentabilidad en el sector (Ortega-Ferrusola et al., 2017).

4.6.1. Evaluación del grado de apoptosis

El pellet de cada uno de los grupos lo resuspendemos en 200 μ L de PBS. Fijamos en etanol al 70% alrededor de 6 horas a 4°C en cámara fría, esta fijación será gota a gota, para evitar la formación de agregados, los cuales podrían dificultar la correcta lectura de datos por el citómetro de flujo.

Una vez pasado ese tiempo las muestras se someten a centrifugación durante 5 minutos a 1200 rpm. Después, se lavará el pellet en PBS para eliminar los posibles restos de etanol.

Se resuspende el pellet en 250 μ L de PBS y se añaden 5 μ L de RNAsa A (10 mg/ml) y se incubarán a 37°C, durante 1 hora.

Por último, se añaden 10 μ L de Ioduro de propidio (1mg/ml) y se realiza el análisis.

4.6.2. Evaluación de daño de membrana con merocianina

A cada una de las alícuotas se le añaden los 100 μ L de merocianina, esperamos unos 5-10 min, para que actúe la sonda fluorescente y se realiza el análisis.

4.6.3 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares lo vamos a medir mediante el método de diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), el dicloro. El protocolo es el siguiente:

A cada una de las alícuotas extraídas anteriormente se le añade dicloro, se añaden a cada una 100 μ L. Después de esto se realiza el análisis.

4.7. Fragmentación de ADN

Para este protocolo se realizará el test de dispersión de la cromatina espermática (SCD), nos permite diferenciar los espermatozoides con daños en el ADN de los que no presentan daños. Para ello se empleará un kit para analizar la fragmentación de ADN espermático de verraco halomax®.

Pasos:

-Primer paso, incluir la muestra de esperma en la agarosa:

Primero, colocar la solución de lisis a temperatura ambiente y la agarosa en el termobloque a 95-100°C, hasta que esté totalmente líquida. Después pasaremos este eppendorf, con un flotador a un baño que se encuentra a 37°C durante 5 minutos, después de esto ya se podrá mezclar con el esperma.

Transferimos 25 μ L de muestra espermática a un tubo eppendorf y añadir a el mismo 50 μ L de agarosa.

En un portaobjetos se realizan dos círculos con un lápiz graso, de esta manera evitaremos que la gota se salga de ese círculo. De la mezcla de agarosa y esperma, transferimos 1,5-2 μ L a cada uno de los círculos y los cubrimos con cubreobjetos de 24x24 mm. Presionar para evitar que se formen burbujas.

El paso siguiente es colocar los portaobjetos en cámara fría a 4°C durante 5 minutos, para que se condense la agarosa.

-Tratado de la muestra espermática:

Una vez pasado el tiempo en la cámara fría, se les quitará con cuidado los cubreobjetos. Aplicar tampón de lisis, fijándonos bien que se cubra todo el círculo, incubamos este durante 5 minutos, después lavar con agua destilada 2 veces durante 5 minutos.

El siguiente paso es deshidratar la muestra, esto lo realizamos con incubaciones en alcoholes de graduación creciente, durante 2 minutos cada una. Lo hacemos en etanol 70%, 80%, 90% y 100%.

Dejar secar e incubar en cámara oscura y con bastante humedad en la disolución de fluorescente DAPI. Después de esto, montar en un medio de montaje al agua con el cubreobjetos y observar en el microscopio de fluorescencia.

4.8. Análisis estadísticos.

Los datos obtenidos en los diferentes grupos y protocolos, se han analizado realizando el test t-Student en el software de Microsoft Excel, consideramos valores significativos cuando $P < 0,05$.

5.RESULTADOS.

5.1. Resultados vitalidad espermática.

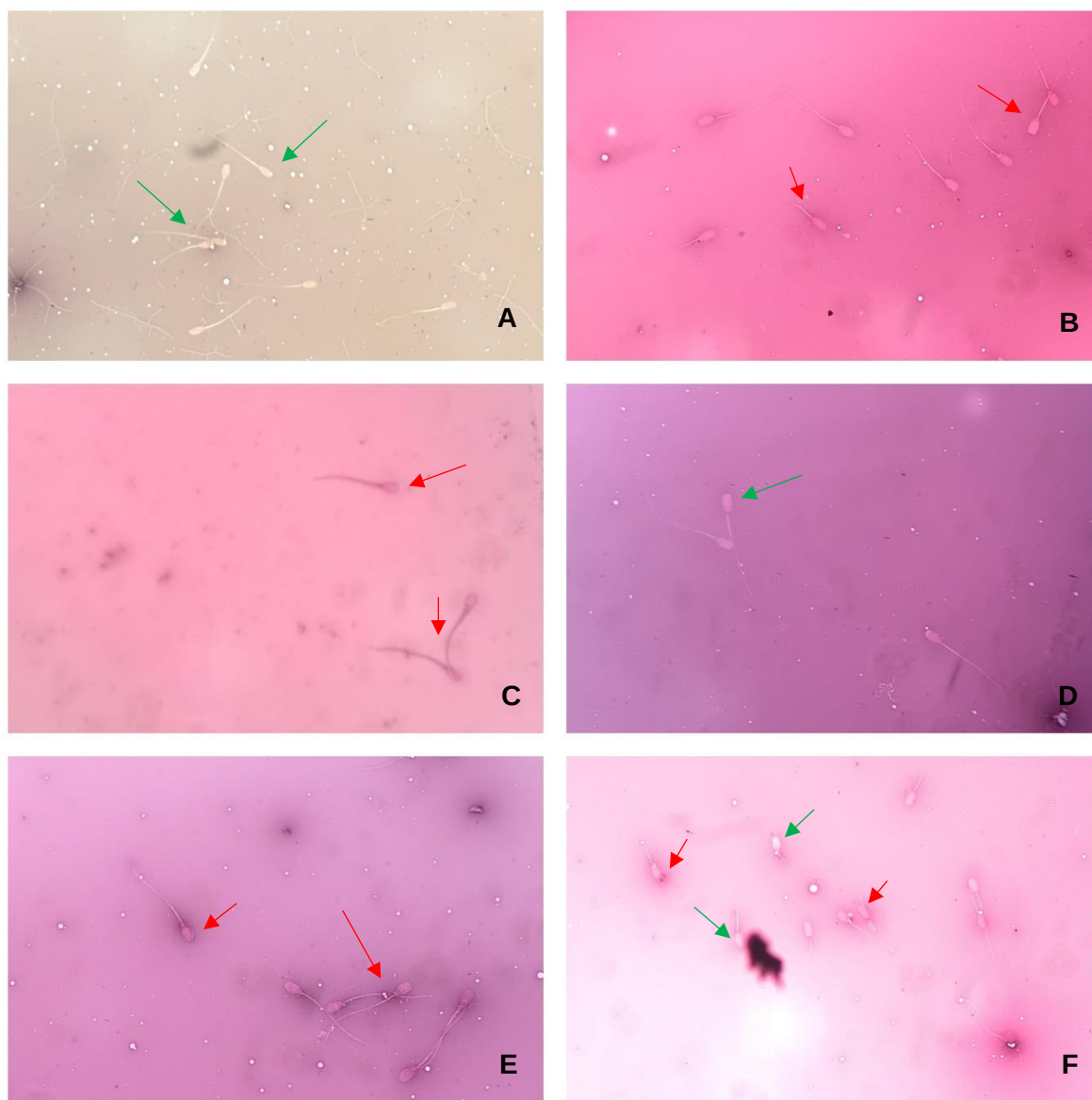


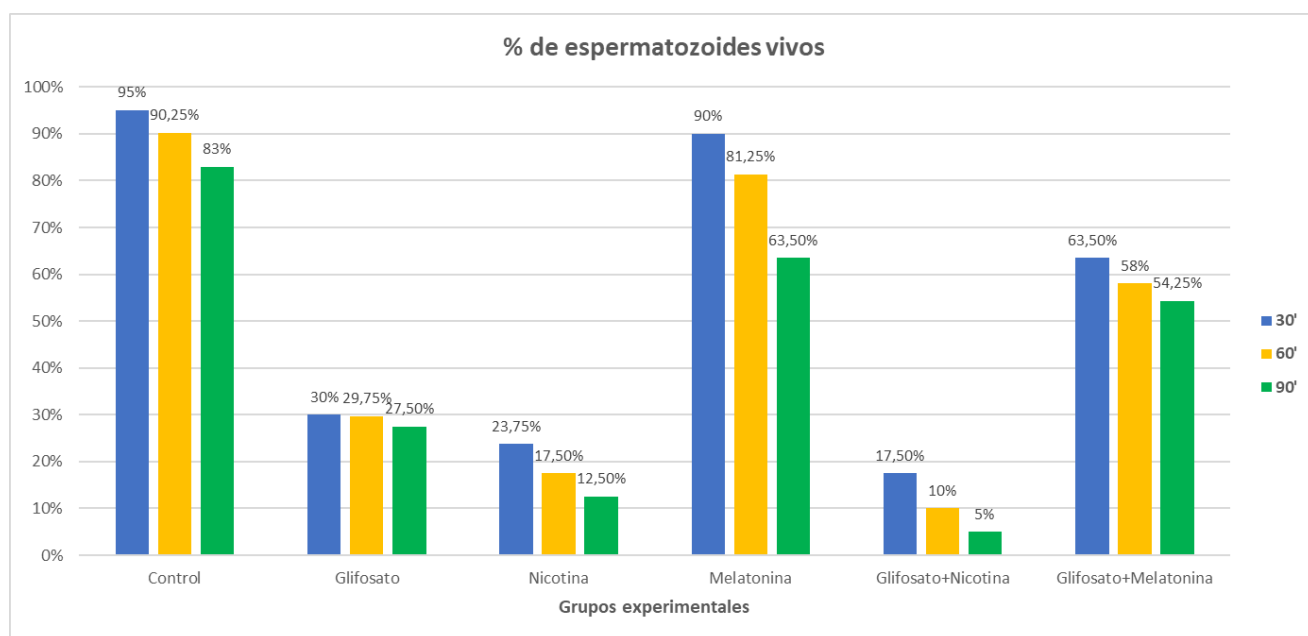
Figura 5.1: tinciones de los distintos grupos experimentales con eosina-nigrosina, para evaluar la vitalidad espermática. Imagen A (grupo control), imagen B (tratamiento con glifosato), imagen C (tratamiento con nicotina), imagen D (tratamiento con melatonina), imagen E (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen F (tratamiento con glifosato y melatonina).

En estas imágenes tomadas con el objetivo 40x se pueden observar los espermatozoides vivos, los cuales se encuentran sin teñir (ejemplos señalados con flechas de color verde) y los espermatozoides muertos (ejemplos señalados con flechas de color rojo). De esta manera vemos que el tratamiento con melatonina

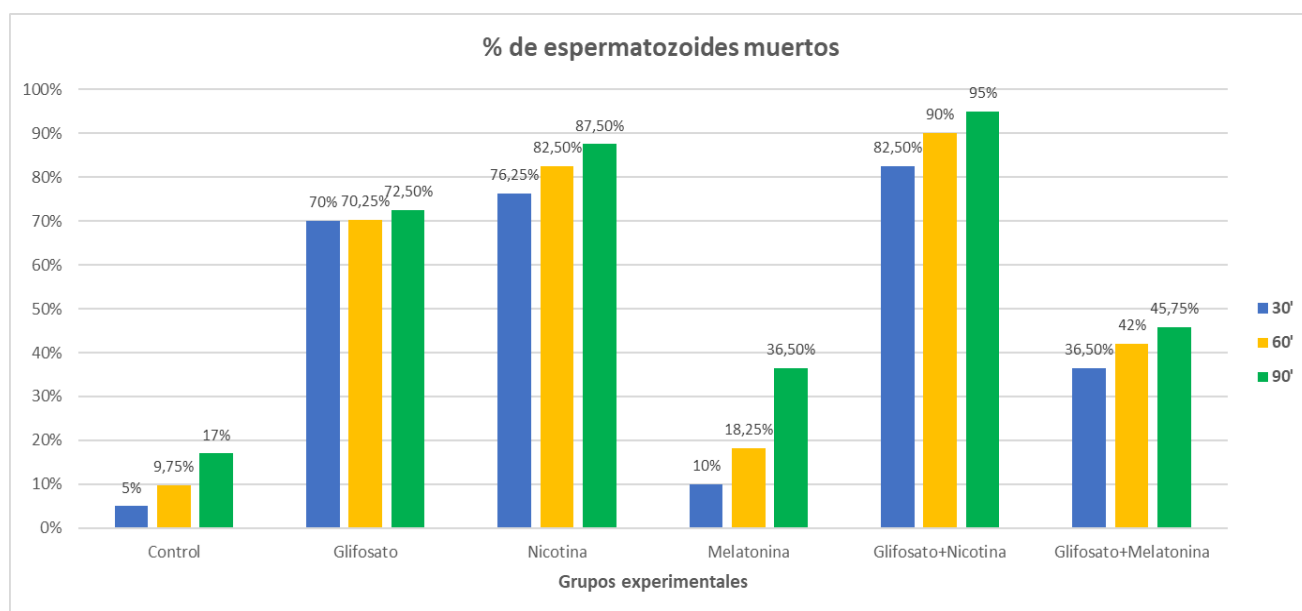
(imagen D), el espermatozoide está normal, esta sustancia, por tanto, no produce daño o altera la vitalidad.

Además, comparando el grupo tratado con glifosato (imagen B), en el cual se visualizan una gran cantidad de espermatozoides, con el tratamiento con glifosato y melatonina (imagen F) podemos ver en esta segunda, una mayor presencia de especies vivas, lo que nos indica un posible efecto reparador.

Realizando el conteo de cada uno de los portaobjetos, obtenemos los siguientes datos:



Gráfica 5.1: porcentaje de espermatozoides vivos en los distintos grupos experimentales y en las distintas mediciones de tiempo (los porcentajes corresponden a la media de las dos réplicas).



Gráfica 5.2: porcentajes de espermatozoides muertos en los distintos grupos experimentales y en las diferentes mediciones de tiempo. (los porcentajes expresados en la gráfica corresponde a la media de las dos réplicas).

Tabla 5.1: resultados del valor de P del test t-Student, de los distintos grupos experimentales, en donde se comparan espermatozoides muertos, para evaluación de la vitalidad (los espacios azules, corresponden a que no es necesario su análisis).

P(valor)	Control	Glifosato	Nicotina	Melatonina	Glifosato + Nicotina	Glifosato + Melatonina
Control		1,274E-10	4,068E-10	0,06501	2,736E-10	6,206E-07
Glifosato					1,535E-05	1,277E-08

Con estos resultados obtenidos tras el análisis estadístico, los cuales todos tienen un valor de $P < 0,05$. Siendo todos los datos significativos.

Nuestros resultados muestran que, en primer lugar, tanto el glifosato y la nicotina, por separado, afectan a la vitalidad, aumentando de manera significativa el número de espermatozoides muertos, también lo hacen y en mayor medida cuando se juntan los dos compuestos en un mismo tratamiento.

Por último, la melatonina, al compararla con el grupo control, obtenemos un valor de P mayor de 0,05. Siendo los datos no significativos, por lo tanto, descartamos la hipótesis de que la melatonina tiene un efecto tóxico, pero si ofrece un efecto protector

significativo (P valor es mucho menor de 0,05) ante el daño del glifosato en la vitalidad espermática.

5.2. Resultados grado de apoptosis

-Resultados de los diferentes grupos experimentales tras 30 minutos de incubación:

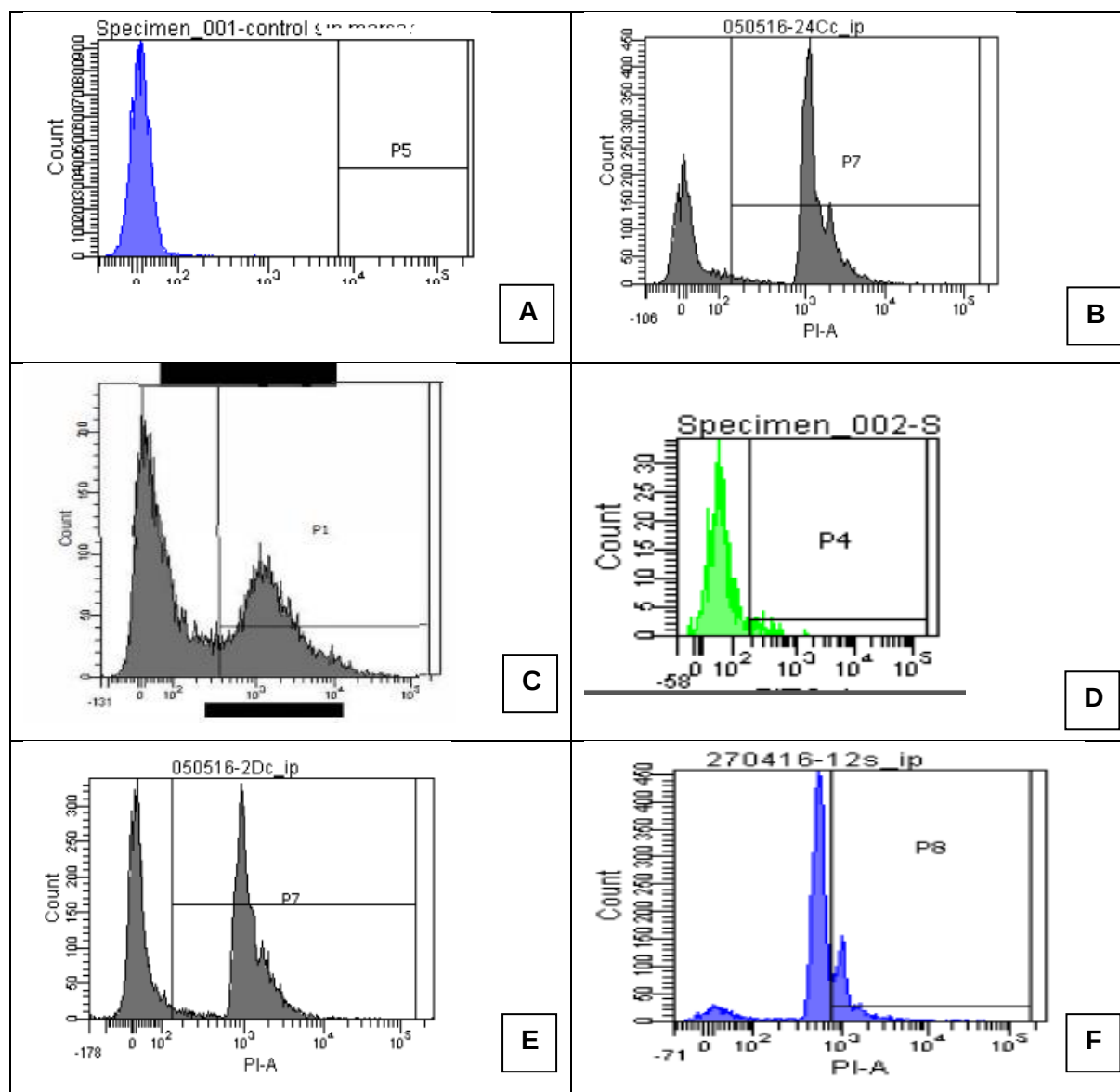
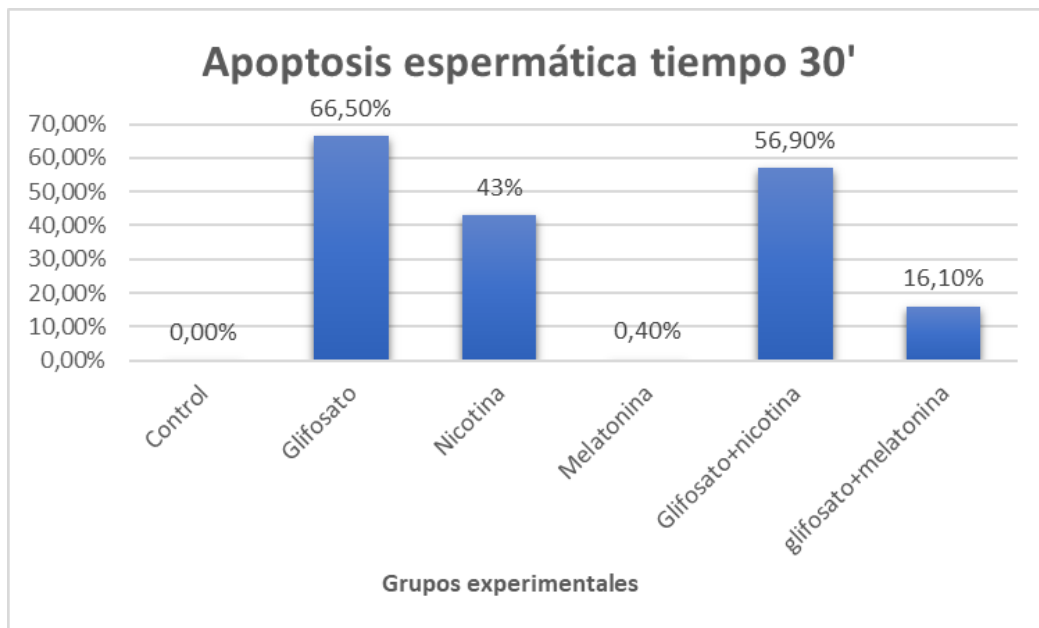


Figura 5.2: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de apoptosis espermática de los distintos grupos experimentales tras 30 minutos de incubación, el pico de apoptosis es a partir de 10^3 : imagen A (grupo control), imagen B (tratamiento con glifosato), imagen C (tratamiento con nicotina), imagen D (tratamiento con melatonina), imagen E (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen F (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.3: Porcentaje de espermatozoides apoptóticos, de los diferentes grupos experimentales medidas tras 30 minutos de incubación.

-Resultados de los distintos grupos experimentales tras 60 minutos de incubación:

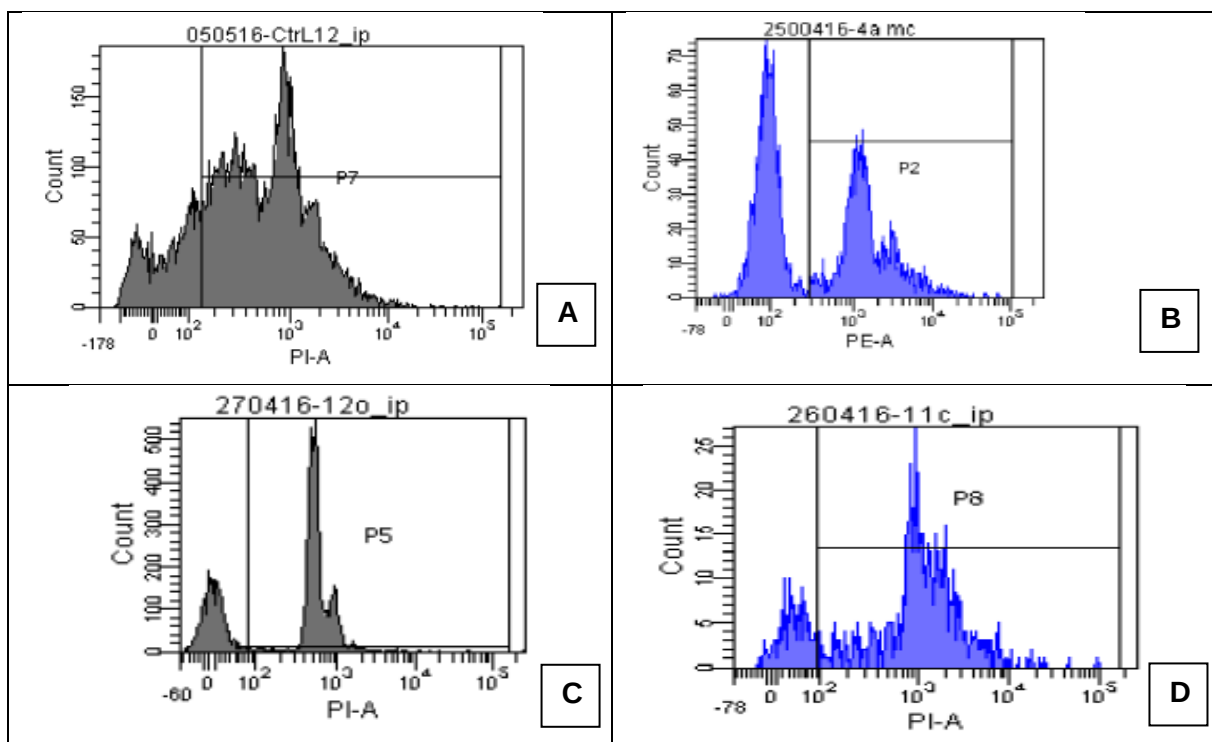
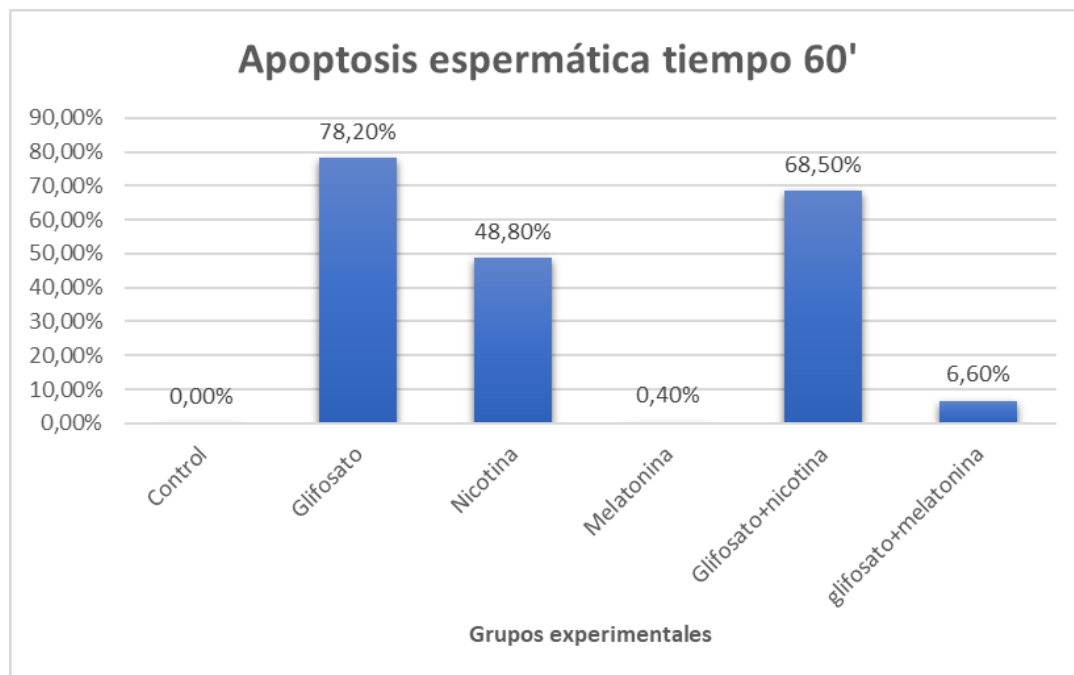


Figura 5.3: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de apoptosis espermática de los distintos grupos experimentales tras 60 minutos de incubación, el pico de apoptosis es a partir de 10^3 : imagen A (tratamiento con glifosato), imagen B (tratamiento con nicotina), imagen C (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen D (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.4: Porcentaje de espermatozoides apoptóticos, de los diferentes grupos experimentales medidas tras 60 minutos de incubación.

-Resultados de los distintos grupos experimentales tras 90 minutos de incubación:

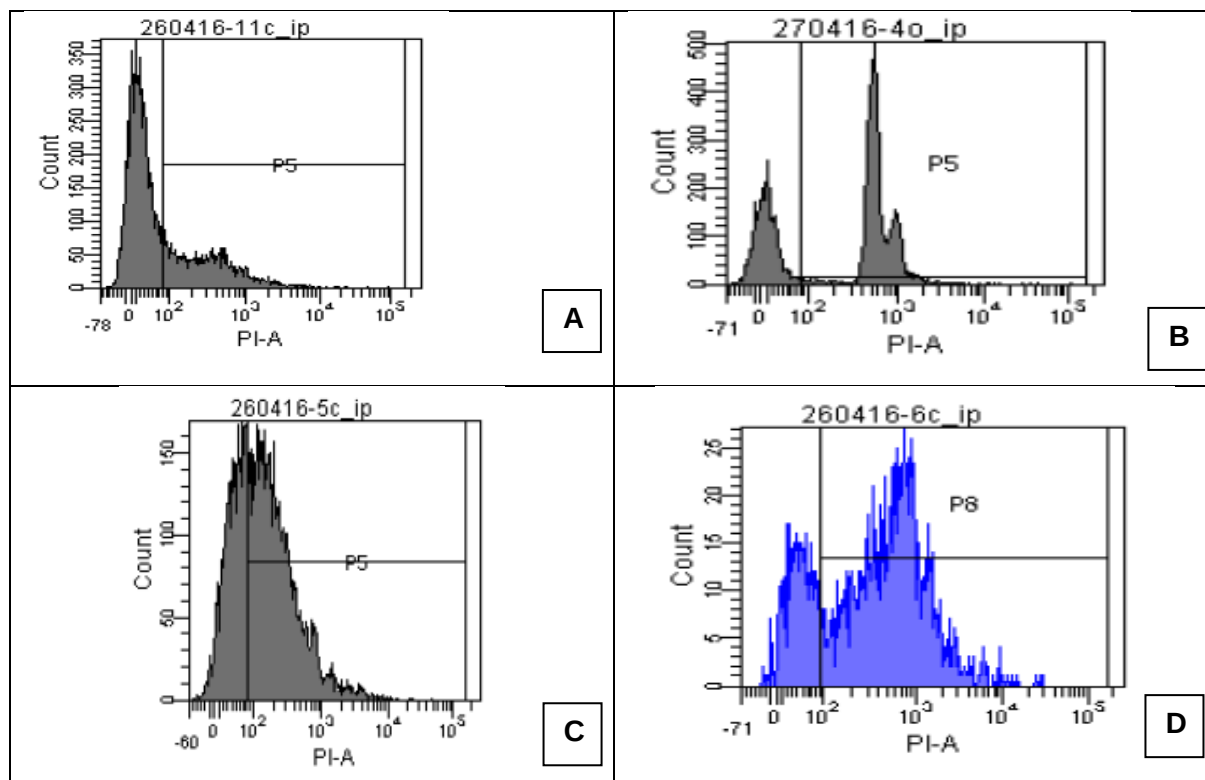
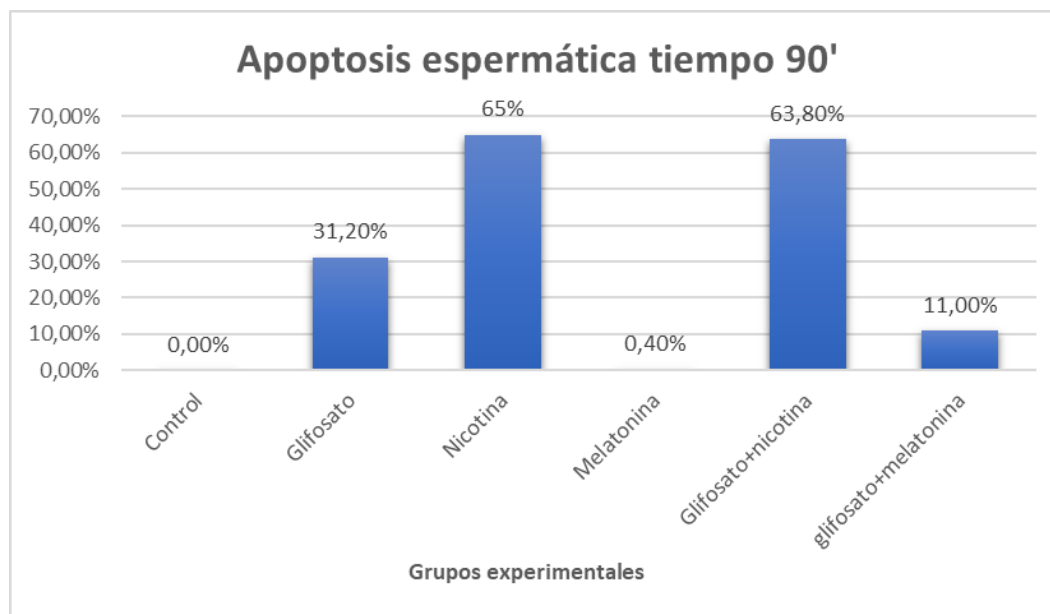


Figura 5.4: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de apoptosis espermática de los distintos grupos experimentales tras 90 minutos de incubación, el pico de apoptosis es a partir de 10^3 : imagen A (tratamiento con glifosato), imagen B (tratamiento con nicotina), imagen C (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen D (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.5: Porcentaje de espermatozoides apoptóticos, de los diferentes grupos experimentales medidas tras 90 minutos de incubación.

Tabla 5.2: resultados del valor de P del test t-Student, de los distintos grupos experimentales, en donde hemos comparado la apoptosis espermática. (los espacios azules corresponden a que no es necesario su análisis).

P (valor)	Control	Glifosato	Nicotina	Melatonina	Glifosato + Nicotina	Glifosato + Melatonina
Control		6,399E-05	1,987E-05	0,09806	A,522E-11	7,157E-05
Glifosato					0,6397	0,000397

Con los resultados obtenidos tras el análisis estadístico, al comparar el grupo control con el grupo tratado con glifosato y el grupo tratado con nicotina, obtenemos un valor de P, mucho menor de 0,05 siendo ambos resultados significativos, decimos entonces que ambas sustancias son dañinas para el espermatozoide, aumentando de manera significativa la cantidad de especies apoptóticas en gran cantidad.

Por otro lado, la acción conjunta de ambos compuestos dañinos, no aumenta el efecto de manera significativa, ya que, al comparar el glifosato con el grupo tratado con glifosato y nicotina, el valor de P es $0,6397 > 0,05$, siendo estos datos no significativos.

Finalmente, la melatonina ejerce un efecto protector significativo frente a los daños del glifosato, puesto que al comparar el grupo tratado con glifosato y el grupo tratado con glifosato y melatonina se obtiene un P valor de $0,000397 < 0,05$, siendo los datos experimentales significativos.

A su vez no hay un efecto tóxico de la melatonina, ya que la presencia de espermatozoides apoptóticos es casi nula en el grupo tratado con melatonina, al igual que en el grupo control, esto se reafirma, ya que al comparar el grupo control con el grupo tratado con melatonina, el P valor $0,09806 > 0,05$ siendo los datos no significativos, descartamos entonces la hipótesis de que la melatonina es una sustancia tóxica para el esperma.

5.3. Resultados especies reactivas de oxígeno (ROS)

-Resultados de los diferentes grupos experimentales tras 30 minutos de incubación:

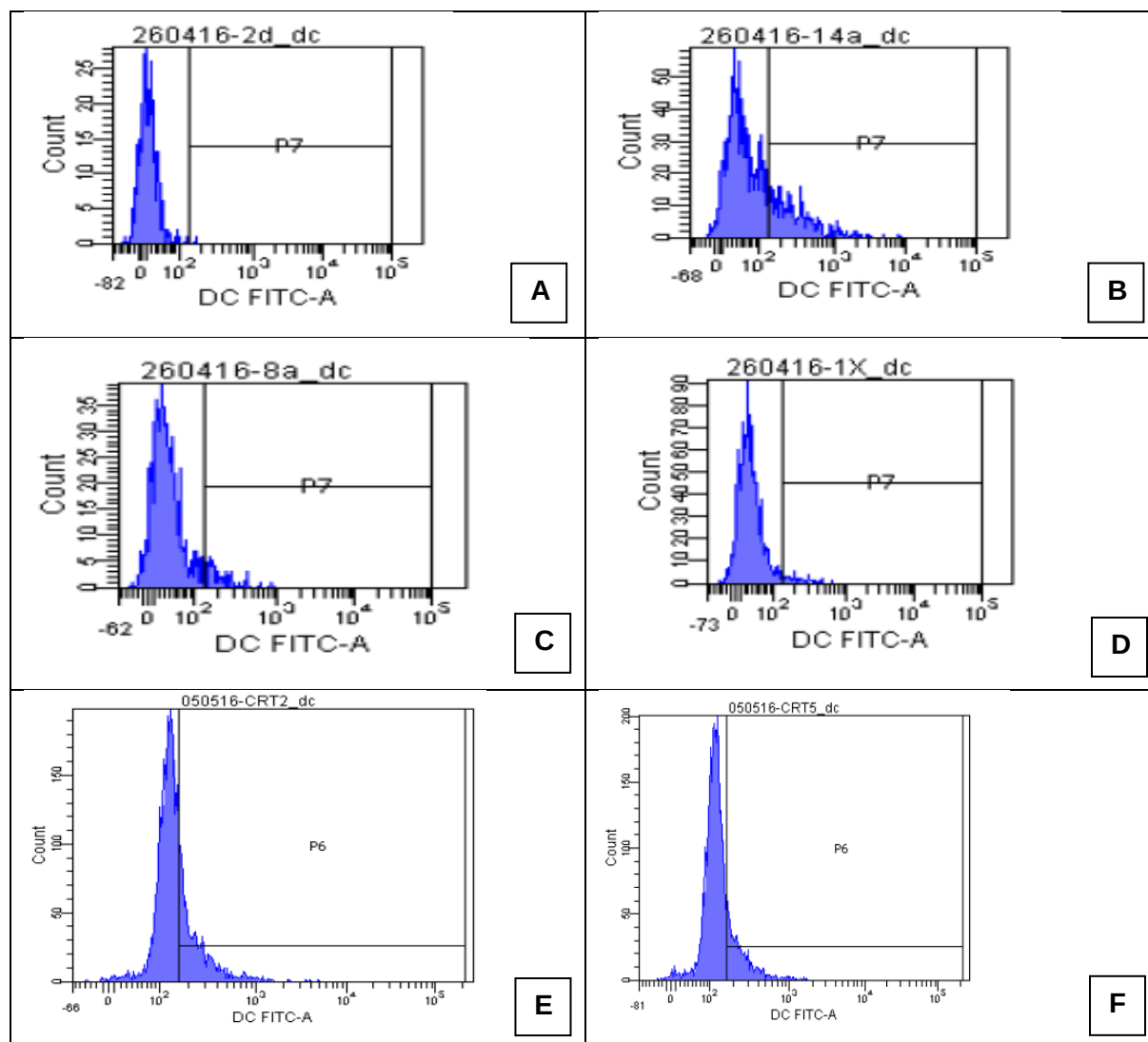
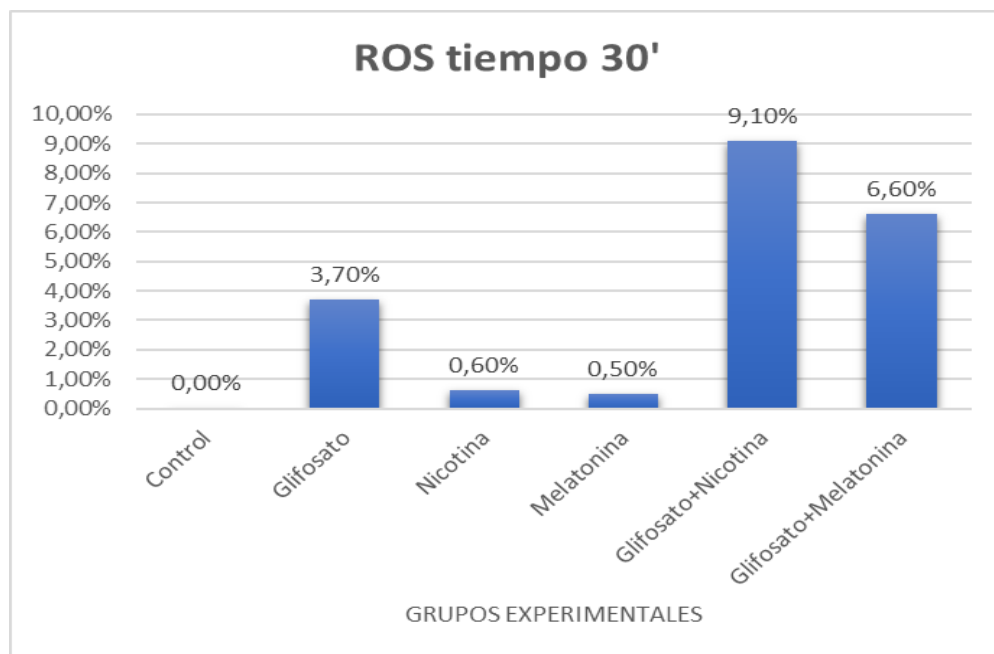


Figura 5.5: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los distintos grupos experimentales tras 30 minutos de incubación: imagen A (grupo control), imagen B (tratamiento con glifosato), imagen C (tratamiento con nicotina), imagen D (tratamiento melatonina), imagen E (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen F (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.6: Porcentaje de espermatozoides con presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los diferentes grupos experimentales medidas tras 30 minutos de incubación.

-Resultados de los diferentes grupos experimentales tras 60 minutos de incubación:

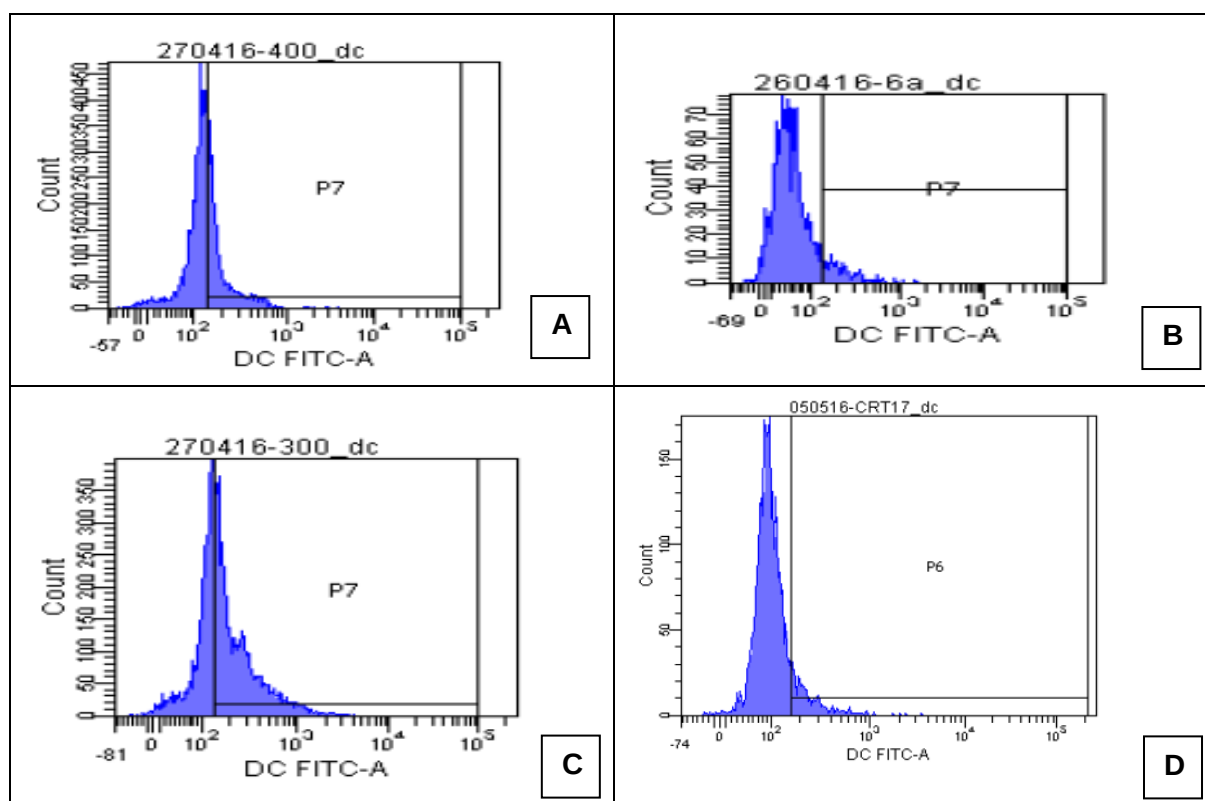
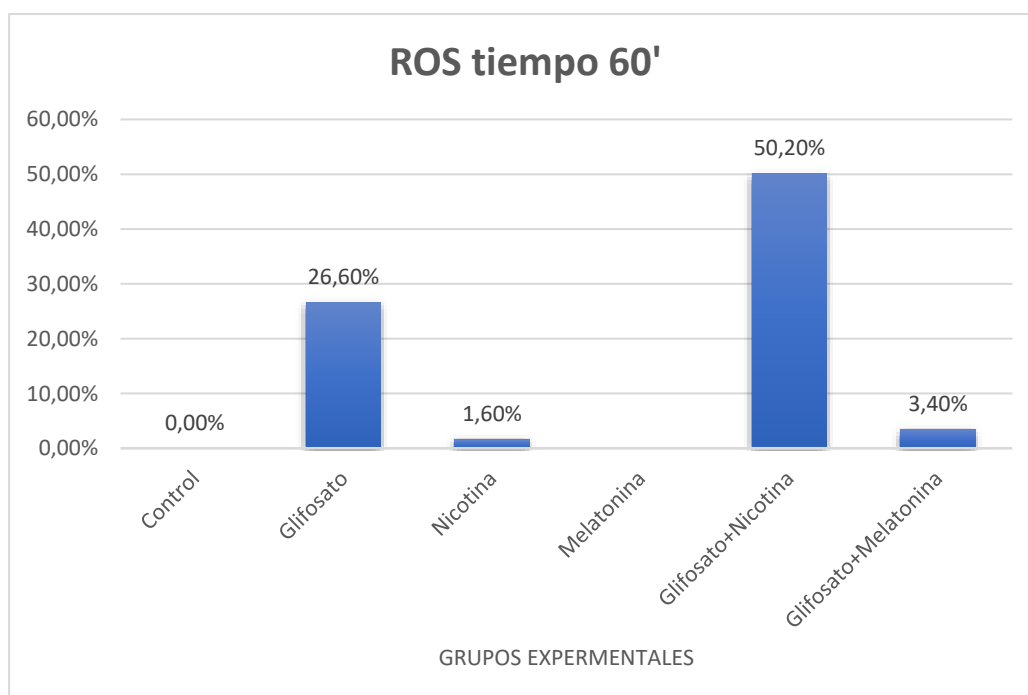


Figura 5.6: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los distintos grupos experimentales tras 60 minutos de incubación: imagen A (tratamiento con glifosato), imagen B (tratamiento con nicotina), imagen C (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen D (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.7: Porcentaje de espermatozoides con presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los diferentes grupos experimentales y medidas tras 60 minutos de incubación.

-Resultados de los diferentes grupos experimentales después de 90 minutos de incubación:

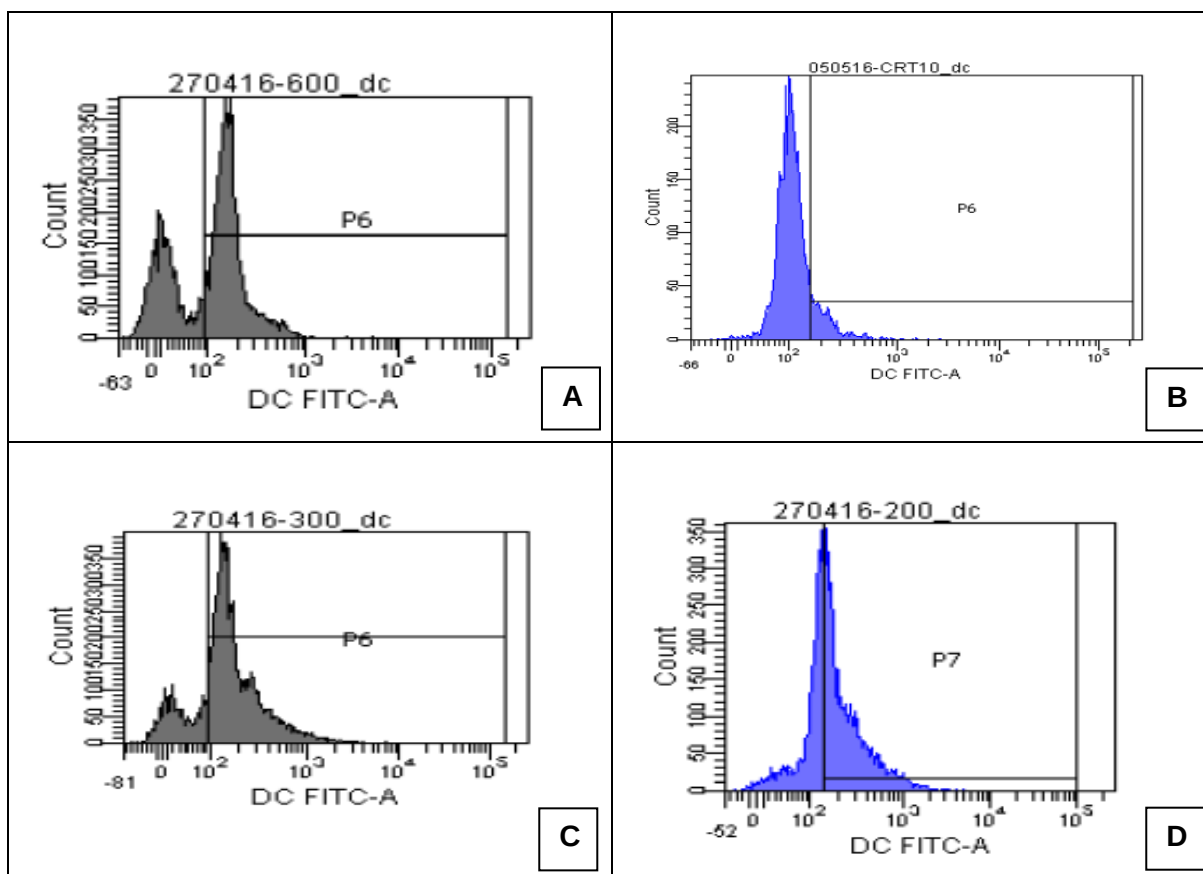
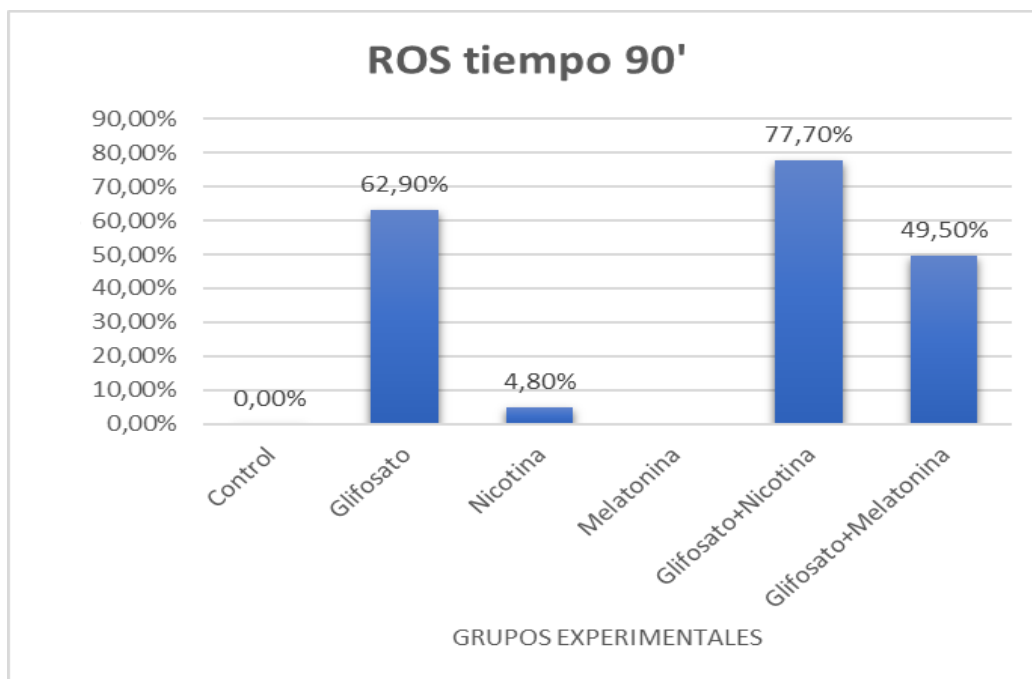


Figura 5.7: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los distintos grupos experimentales tras 90 minutos de incubación: imagen A (tratamiento con glifosato), imagen B (tratamiento con nicotina), imagen C (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen D (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.8: Porcentaje de espermatozoides con presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los diferentes grupos experimentales medidas tras 90 minutos de incubación.

Tabla 5.3: resultados del valor de P del test t-Student, de los distintos grupos experimentales, en donde hemos comparados espermatozoides con especies reactivas de oxígeno. (el espacio en blanco corresponde a que no se ha podido analizar, debido a la falta de datos y los azules, es que no es necesario su análisis).

P(valor)	Control	Glifosato	Nicotina	Melatonina	Glifosato+Nicotina	Glifosato+Melatonina
Control		0,01725	0,01549		0,00467	0,03204
Glifosato					0,40155	0,45332

Viendo los análisis estadísticos se puede confirmar que tanto los datos obtenidos en los grupos 2 (tratamiento con glifosato) y 3 (tratamiento con nicotina), son significativos, puesto que el P-valor obtenido es menor de 0,05. Por lo tanto, ambos reactivos son dañinos para el espermatozoides, generando un aumento de especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, cuando comparamos el grupo 5 (tratamiento con glifosato y melatonina), con el grupo 2 (tratamiento con glifosato) obtenemos un p-valor de $0,40155 > 0,05$ siendo estos datos no significativos, significando esto que no se percibe un efecto protector de la melatonina frente el glifosato y su generación de especies reactivas de

oxígeno. Este efecto protector, se observa en el minuto 90, al mirar la gráfica una reducción del 13,4% de espermatozoides con especies reactivas de oxígeno, es un efecto no significativo ya que es leve, pero se observa en las gráficas. Decimos que hay diferencias, pero sin significación.

Luego, en el grupo 4 (tratamiento con glifosato y nicotina), al compararlo con el grupo tratado con glifosato, obtenemos un P-valor mayor de 0,05, estos datos los definimos como no significativos, por tanto, no hay un aumento del daño y con él, un aumento de especies reactivas de oxígeno al mezclar ambos reactivos.

Por último, en el grupo 3 (tratamiento con melatonina), estadísticamente no podemos decir si la melatonina tiene algún efecto frente a la generación de especies reactivas de oxígeno o no, ya que solo tenemos los datos de los 30 minutos de incubación y nos faltan los de a 60 y 90 minutos, pero en esos 30 primeros minutos, si observamos que no se producen especies reactivas de oxígeno (ROS).

5.4. Resultados de daño de membrana con merocianina

-Resultados de los distintos grupos experimentales tras 30 minutos de incubación:

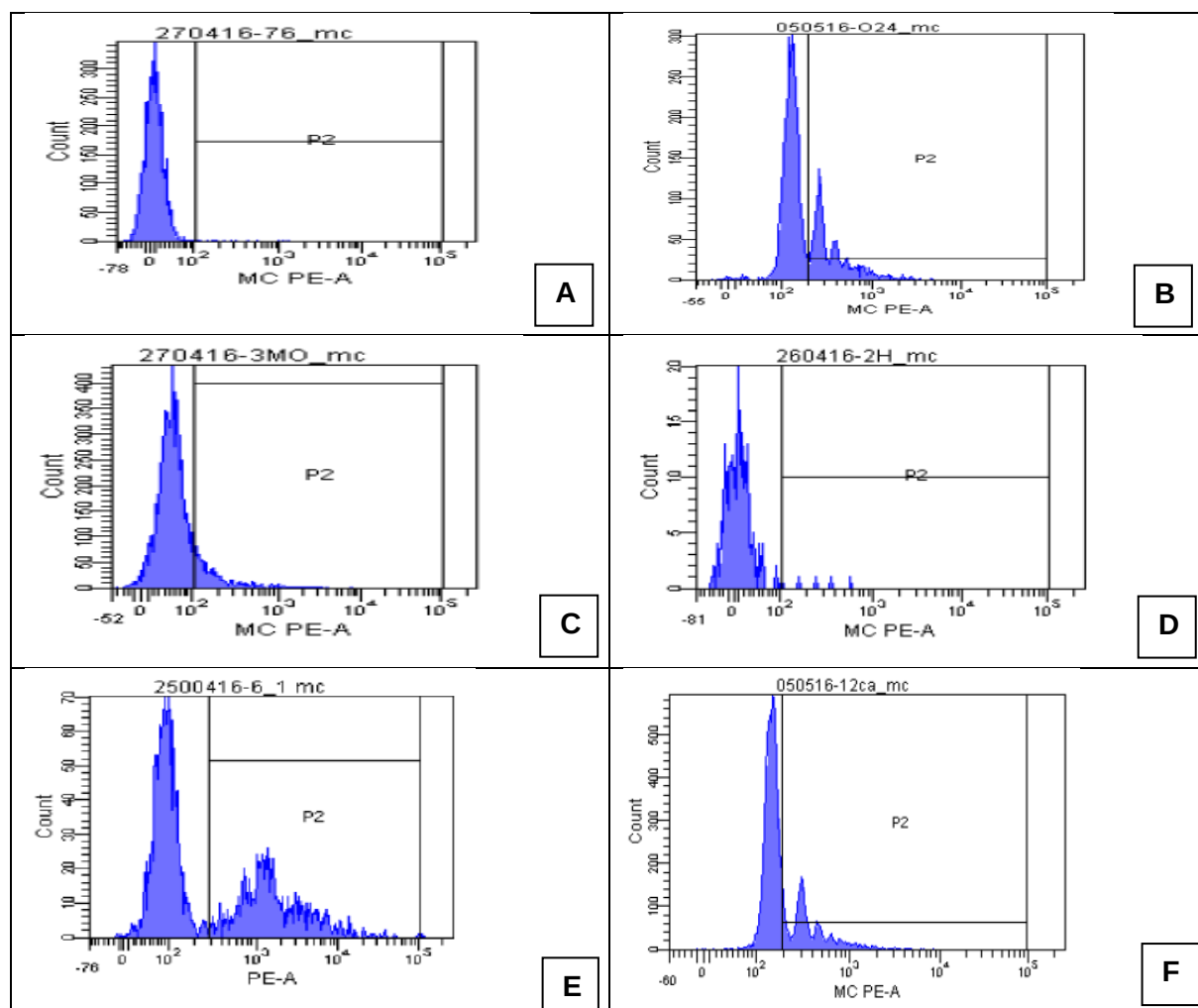
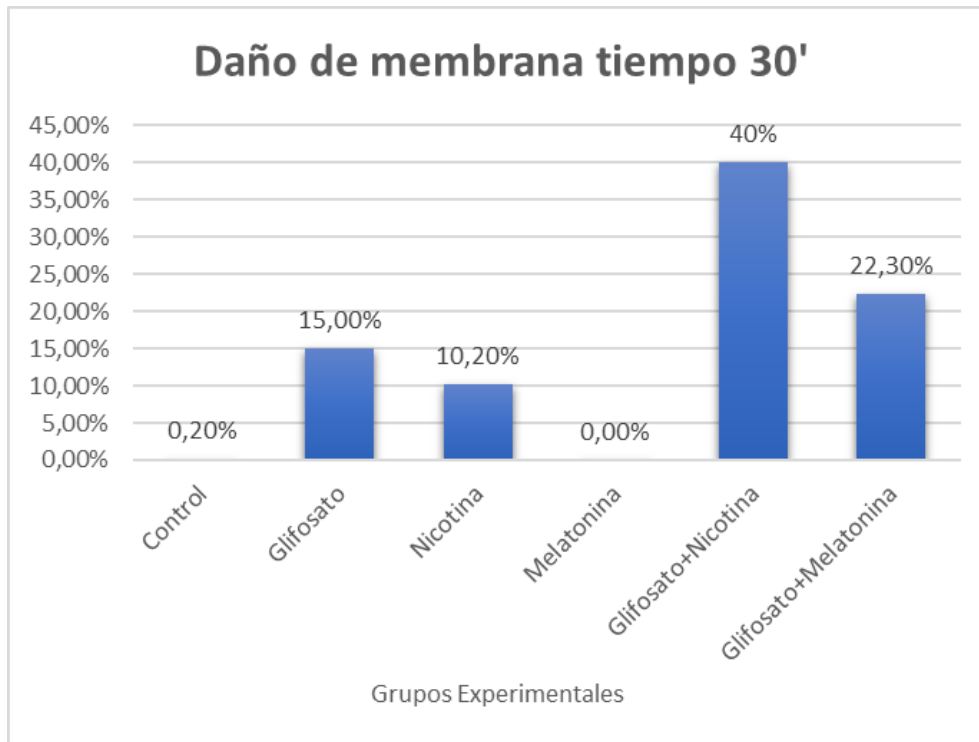


Figura 5.8: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de daño de membrana espermática de los distintos grupos experimentales tras 30 minutos de incubación: imagen A (grupo control), imagen B (tratamiento con glifosato), imagen C (tratamiento con nicotina), imagen D (tratamiento melatonina), imagen E (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen F (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.9: porcentajes de espermatozoides que presentan daño en su membrana de los diferentes grupos experimentales y medidos tras 30 minutos de incubación.

-Resultados de los distintos grupos experimentales tras 60 minutos de incubación:

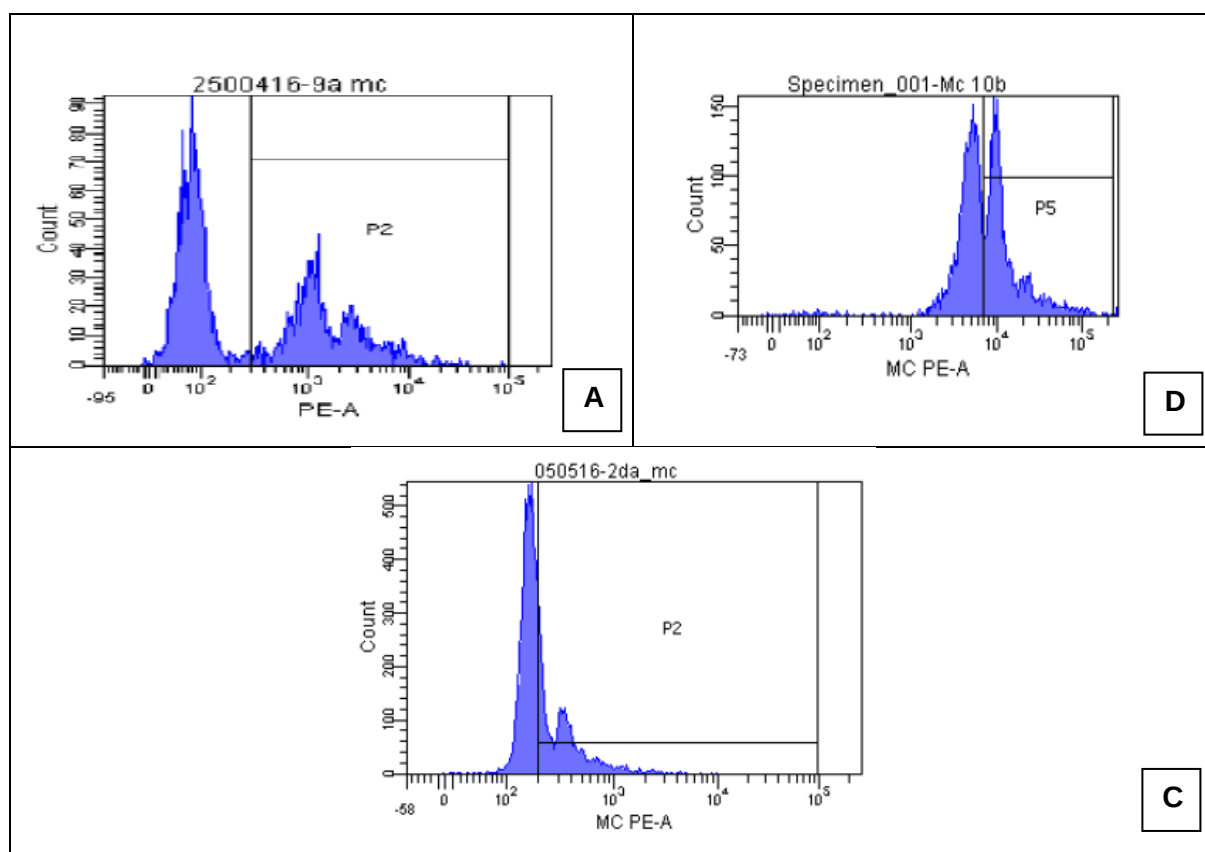
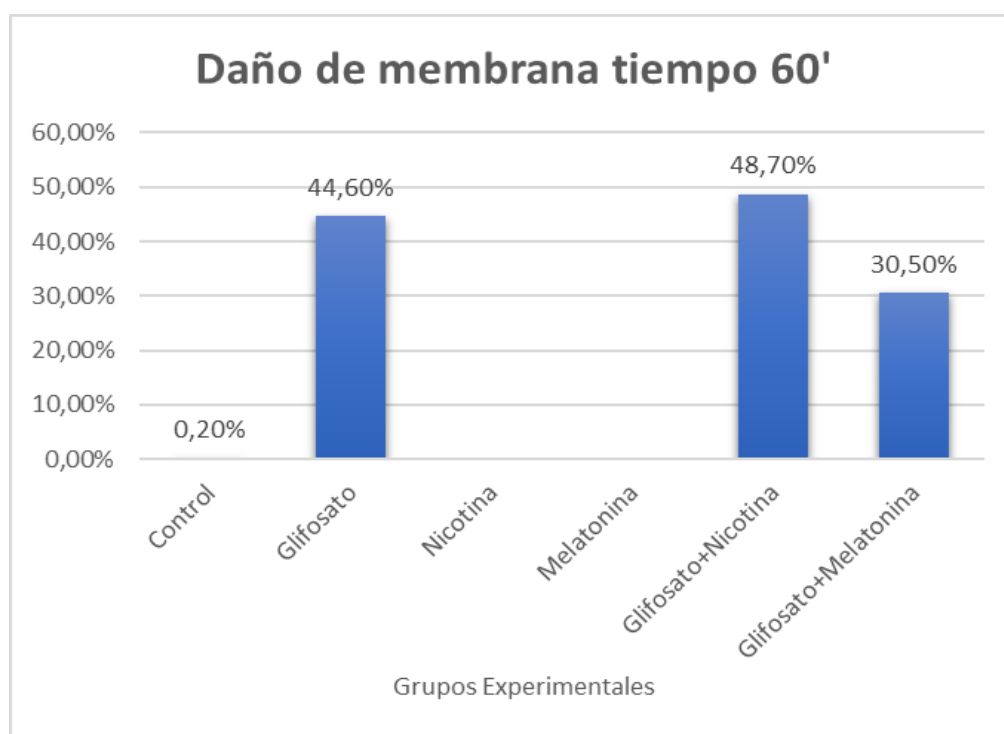


Figura 5.9: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de daño de membrana espermática de los distintos grupos experimentales tras 60 minutos de incubación: imagen A (tratamiento con glifosato), imagen B (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen C (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.10: porcentajes de espermatozoides que presentan daño en su membrana de los diferentes grupos experimentales y medidos tras 60 minutos de incubación. En los grupos donde no aparece ningún porcentaje es porque se desconoce ese dato.

-Resultados de los diferentes grupos experimentales tras 90 minutos de incubación:

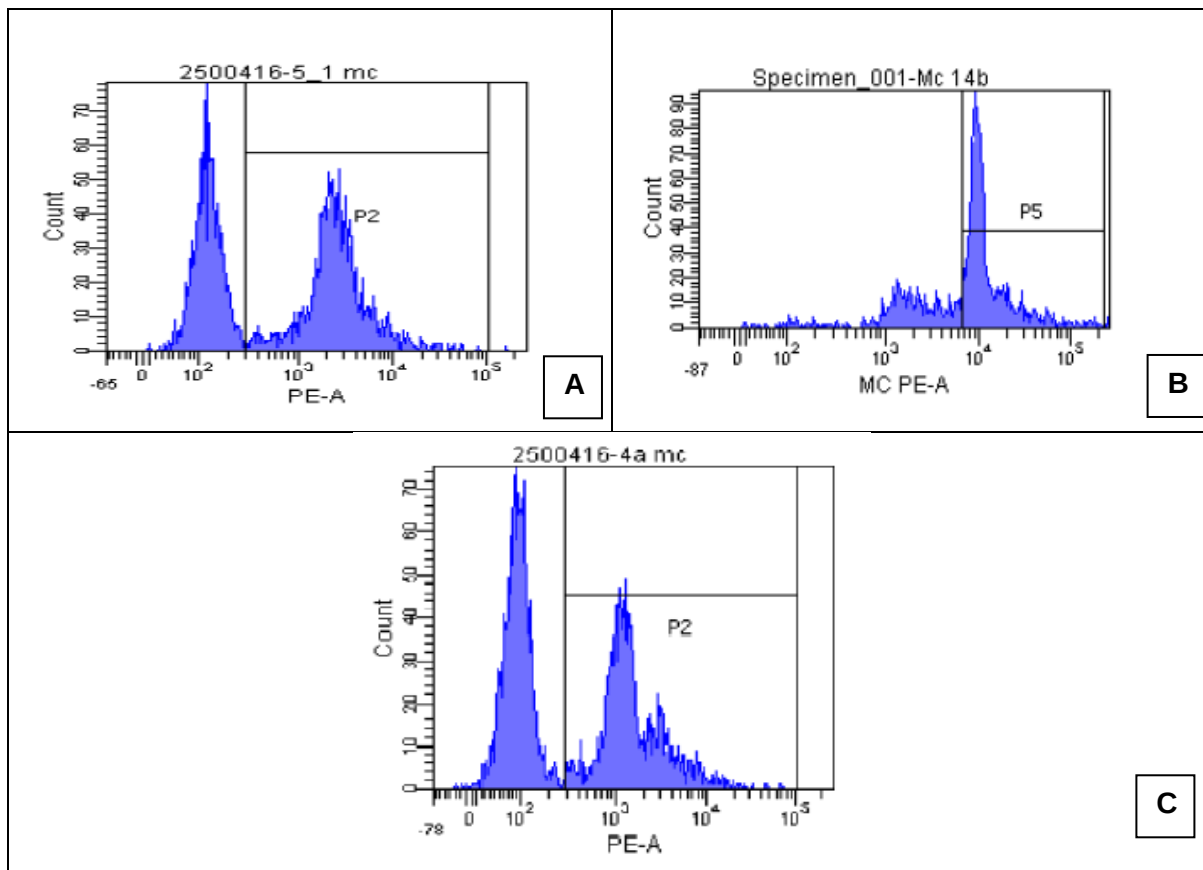
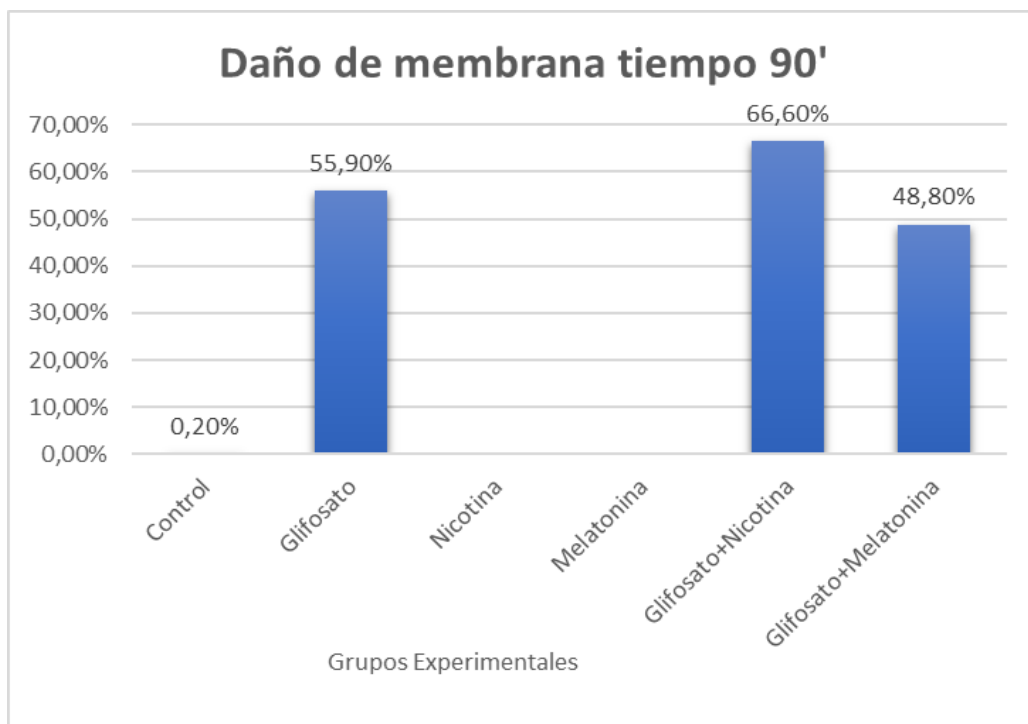


Figura 5.10: Imágenes que corresponden a las gráficas de dispersión con los resultados de daño de membrana espermática de los distintos grupos experimentales tras 90 minutos de incubación: imagen A (tratamiento con glifosato), imagen B (tratamiento con glifosato y nicotina) e imagen C (tratamiento con glifosato y melatonina).



Gráfica 5.11: porcentajes de espermatozoides que presentan daño en su membrana de los diferentes grupos experimentales y medidos tras 90 minutos de incubación. En los grupos donde no se visualiza ningún porcentaje, es debido a que no se visualizaron datos.

Tabla 5.4: resultados del valor de P del test t-Student, de los distintos grupos experimentales, en donde hemos comparados espermatozoides con daños de membrana. (los espacios en blanco corresponden a que no se han podido analizar, debido a la falta de datos y los azules, es que no es necesario su análisis).

P-valor	Control	Glifosato	Nicotina	Melatonina	Glifosato +Nicotina	Glifosato +Melatonina
Control		0,00056			1,09602E-06	4,76459E-05
Glifosato					0,17838	0,62418

Viendo los resultados estadísticos obtenidos, en primer lugar, el grupo tratado con glifosato (grupo 1), comparándolo con el grupo control obtenemos un p-valor de $0,00056 < 0,05$. Por esta razón, los datos son significativos e indican que el glifosato es responsable de ejercer un daño de membrana.

Por otro lado, en el grupo tratado con glifosato y melatonina (grupo 5), obtenemos un p-valor de 0,62418, dato mucho mayor que 0,05. Siendo estos datos no significativos,

decimos que no se ve un efecto protector de la melatonina frente al glifosato, al menos frente a daños de membrana espermática. En las gráficas si se ven leves diferencias de efecto protector, pero sin significación.

También, en el grupo tratado con glifosato y nicotina (grupo 4), el p-valor obtenido es mayor de 0,05. Estos datos tampoco serán significativos, indicando que la suma de ambos reactivos no hace que el efecto de daño de membrana sea mayor.

Por último, en los grupos tratados con nicotina (grupo 2) y tratados con melatonina (grupo 3), no se pueden analizar, ya que solo tenemos resultados a los 30 minutos de incubación, por la falta de muestra espermática en las dos siguientes mediciones al analizarse en el citómetro de flujo.

5.5. Resultados de fragmentación de ADN

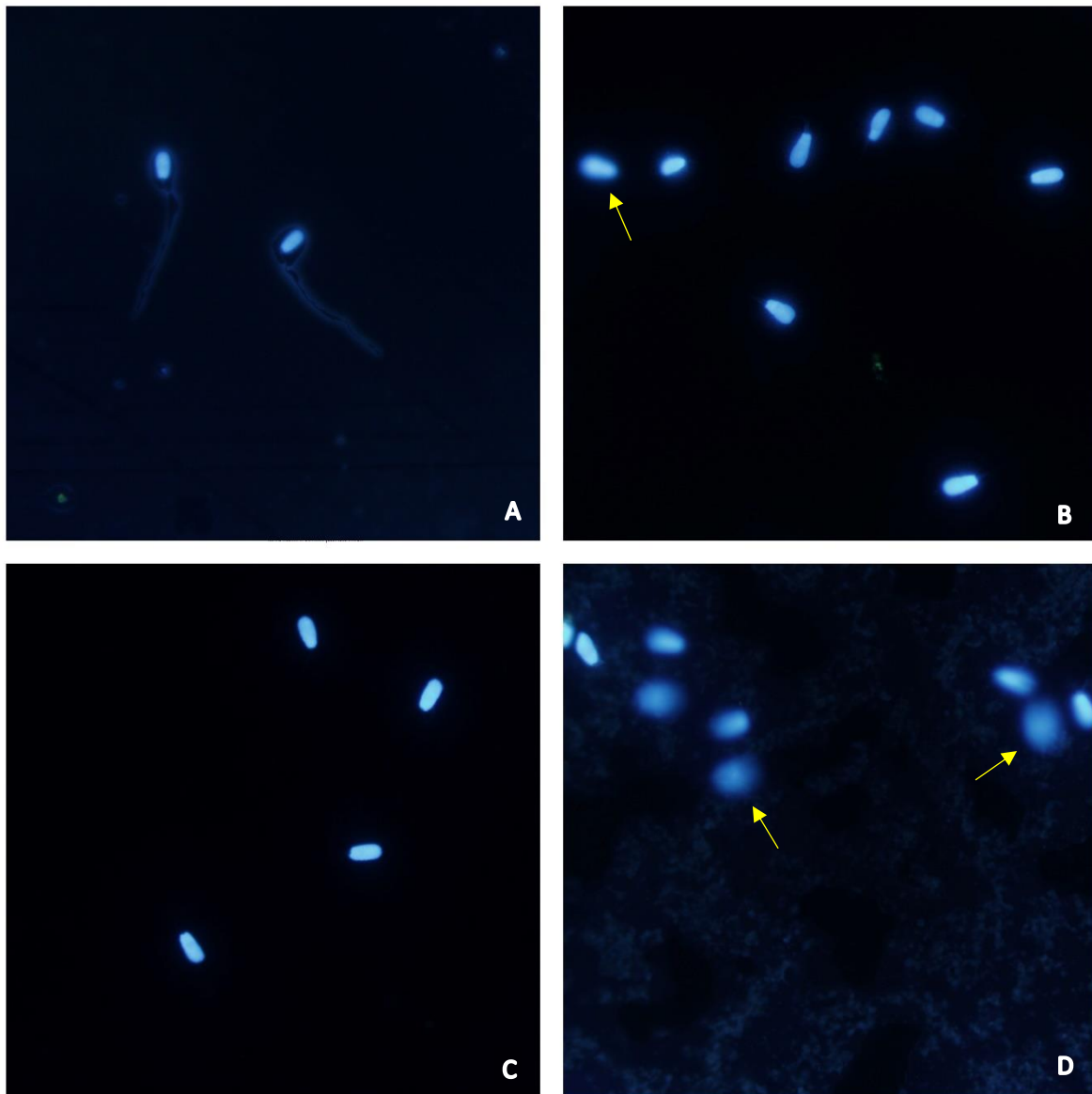


Figura 5.11: Resultados de fragmentación de ADN, imagen A (grupo control), imagen B (tratamiento con herbicida 30'), imagen C (tratamiento con melatonina) e imagen D (tratamiento con herbicida 90').

En las imágenes B y D, podemos ver la aparición de halos (ejemplos señalados con flechas amarillas), esto se debe a que el ADN se encuentra dañado, por lo tanto, observamos que el glifosato provoca daños por fragmentación de ADN en el espermatozoide, los cuales aumentan en número a medida que aumenta el tiempo de incubación, viendo más cantidad de halos en la imagen D. En cambio, en la imagen C, que corresponde al tratamiento con melatonina, no vemos estos halos, pudiendo confirmar que la melatonina no es una sustancia nociva para el espermatozoide.

6.DISCUSIÓN

En este estudio nos centramos en la experimentación de forma directa sobre espermatozoide in vitro de porcino, para dar a conocer si el glifosato ocasiona efectos adversos, como ya se han visto en otros estudios. A su vez, observar si la melatonina, antioxidante el cual se ha demostrado que ejerce un efecto protector en otros aspectos, pero no se sabe nada frente al glifosato. También queremos ver el efecto de la nicotina, químico muy normalizado entre la sociedad, que cada vez preocupa más, por la cantidad de efectos nocivos para nuestro cuerpo.

Durante el transcurso del experimento se utilizaron técnicas de microscopía óptica, para el análisis de la vitalidad y microscopia de fluorescencia, para observar daños en el ADN. También, mediante citometría de flujo, gracias al uso de sustancias como la merocianina, para analizar daño de membrana, dicloro, para analizar especies reactivas de oxígeno y el ioduro de propidio para estudiar la apoptosis espermática.

En cuanto a la vitalidad espermática, el glifosato y la nicotina afectan en gran medida y este aumenta a medida que transcurre el tiempo de incubación, el efecto protector de la melatonina en este caso si se aprecia y no se observa un efecto nocivo.

No hay estudios que se centren en la vitalidad espermática con tratamientos de glifosato, pero si afecta a la cantidad de espermatozoides en el conteo, esto es por que mueren, o a la formación de estos, que de manera indirecta genera una mayor cantidad de especies apoptóticas, generando la muerte. (Pham et al., 2019), en la nicotina se vieron en estudios previos, resultados similares al glifosato (Oyeyipo et al., 2011). La melatonina ha incrementado la calidad espermática en ganado (Cebrián-

Pérez et al., 2014) así como vemos en nuestro estudio, que incluso frente a una sustancia dañina, ejerce ese efecto de protección.

No hay estudios previos que se centren en el estudio de la apoptosis espermática con tratamientos de glifosato y nicotina, pero si en aspectos secundarios que son indicativos de apoptosis o de inducción de esta, como son las especies reactivas de oxígeno, daños en el acrosoma, alteraciones morfológicas, eficiencia respiratoria mitocondrial y alteraciones en el ADN.

Por todos estos aspectos secundarios podemos deducir que el glifosato y la nicotina son responsables de un incremento de generación de especies apoptóticas en la fracción espermática, en nuestro estudio lo afirmamos, viendo este efecto significativo y además en gran cantidad.

Los efectos del glifosato en la apoptosis del espermatozoide son revertidos de manera significativa por la melatonina, observándose un gran efecto protector en la apoptosis espermática, esto está muy relacionado con la vitalidad, la cual también se ha visto protegida por la melatonina. En un estudio previo, los indicadores de apoptosis se vieron reducidos con un tratamiento basado en este antioxidante y con esta reducción, también bajaron los niveles de espermatozoide apoptótico (Li et al., 2019). Tampoco se visualiza efecto tóxico de este compuesto.

La gran sensibilidad que presentan los espermatozoides hacia estrés oxidativo, hace que se busquen nuevos tratamientos preventivos frente a esto y también, una búsqueda de sustancias que son las culpables de un mayor daño oxidativo y por lo tanto dañinas para el espermatozoide. Es importante ver si nuestros reactivos generan especies reactivas de oxígeno, ya que esto a su vez afecta a la apoptosis espermática y a daños en el ADN (Zhao et al., 2021). En el caso de la nicotina, si había estudios previos que la culpabilizaban de la generación de especies reactivas de oxígeno (Saleh et al., 2002).

En nuestros resultados obtenidos, podemos decir también que la nicotina incrementa la presencia de especies reactivas de oxígeno en el espermatozoide, coincidiendo con los estudios previos. Además, añadimos otro responsable de esto y es el glifosato, el cual afecta en mayor medida que la nicotina y a medida que aumenta el tiempo de incubación, el daño aumenta.

Por otro lado, el efecto protector de la melatonina frente a daños oxidativos, se ha demostrado ese efecto cuando el daño es por criopreservación (Karimfar et al., 2015) o por calor (Zhao et al., 2021), ante el glifosato no se observa este efecto protector

significativo, se observan leves mejoras en los valores, pero no son significativos y esto puede ser por que en ambos estudios previos, la melatonina se añade un tiempo antes de cada uno de los tratamientos. En este, los grupos con melatonina, esta se añade en primer lugar, pero no esperamos un tiempo de incubación previo y luego añadimos lo demás. También se puede deber a los efectos tan nocivos que tiene el glifosato y se necesite de otro tipo de antioxidante para revertir dichos efectos.

El daño de membrana es inducido por la peroxidación lipídica y el aumento de especies reactivas de oxígeno, siendo por tanto las sustancias que afectan a estas dos, desencadenantes de daños de membrana. En nuestro estudio, posicionamos al glifosato como culpable de esto, además estos datos se respaldan con los anteriores, al ver que genera especies reactivas de oxígeno y están relacionados. La nicotina no podemos concretar que genere daños, por la falta de datos, pero si genera especies reactivas de oxígeno y de esta manera podría afectar, al estar relacionadas.

Por otro lado, la melatonina, no se ve un efecto protector significativo, aunque mejoran los valores levemente, pero esto se puede deber también a lo mismo explicado en el caso de las especies reactivas de oxígeno, ya que están relacionadas.

En cuanto a la fragmentación de ADN, no hay una gran cantidad de estudios que respalden el efecto negativo del glifosato al respecto, al contrario, en un estudio el cual utiliza la misma concentración de glifosato que en nuestra investigación, no se ven efectos significativos a una hora de incubación (Anifandis et al., 2018). Coincide esto también en semen porcino (Nerozzi et al., 2020).

Pero en la visualización a microscopia de fluorescencia, si vemos efectos negativos, mucho más notables a los 90 minutos de incubación. Esto se puede deber a que en los estudios previos realizan un conteo, con su posterior análisis de porcentaje SCF y nosotros nos centramos en ver las diferencias. No hay estudios al respecto de efectos de la melatonina, tanto si ejercen un efecto negativo, como positivo, en nuestro caso no se puede verificar efectos protectores, por no haber obtenido datos al respecto, pero si podemos verificar que no se ven efectos negativos en el tratamiento con melatonina.

7.CONCLUSIÓN

Las conclusiones que se han obtenido en este trabajo son las siguientes:

1. El glifosato afecta negativamente a la vitalidad, aumenta el número de especies reactivas de oxígeno, la apoptosis espermática, los daños de membrana y fragmentación del ADN espermático.
2. Se ha probado que la nicotina afecta a la vitalidad espermática, aumentando la mortalidad, también genera un aumento en las especies reactivas de oxígeno y aumenta la apoptosis espermática.
3. La mezcla de ambos reactivos, glifosato y nicotina, tiene una acción sinérgica en la vitalidad. Esto no es así en los daños de membrana, apoptosis y en la generación de especies reactivas de oxígeno.
4. El efecto antioxidante y protector de la melatonina ante el daño por glifosato se ha demostrado en la vitalidad espermática y en la apoptosis espermática, en los demás aspectos, como el daño de membrana y generación de especies reactivas de oxígeno, no se ha visto un efecto protector significativo.
5. Por último, se ha demostrado que la melatonina no ejerce un efecto tóxico para la vitalidad, apoptosis y la fragmentación de ADN espermático.

8.BIBLIOGRAFÍA

- Abarikwu, S. O., Akiri, O. F., Durojaiye, M. A., y Adenike, A. (2015). Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(1), 70–80.
- Agarwal, A., y Said, T. M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, 9(4), 331–345.
- Agarwal, Ashok, Mulgund, A., Hamada, A., y Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–9.
- Aitken, R. J., y Baker, M. A. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(28), 10.
- Anifandis, G., Amiridis, G., Dafopoulos, K., Daponte, A., Dovolou, E., Gavriil, E., Gorgogietas, V., Kachpani, E., Mamuris, Z., Messini, C. I., Vassiou, K., y Psarra, A. M. G. (2017). The in vitro impact of the herbicide roundup on human sperm motility and sperm mitochondria. *Toxics*, 6(1), 1–9.

- Anifandis, G., Katsanaki, K., Lagodonti, G., Messini, C., Simopoulou, M., Dafopoulos, K., y Daponte, A. (2018). The effect of glyphosate on human sperm motility and sperm DNA fragmentation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(6).
- Approaches, C. C. (2012). *Male fertility book, Andrology* (S. J. Parekattl y A. Agarwal (eds.)).
- Arango, L., Buddrus-Schiemann, K., Opelt, K., Lueders, T., Haesler, F., Schmid, M., Ernst, D., y Hartmann, A. (2014). Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready® soybean. *European Journal of Soil Biology*, 63(June), 41–48.
- Aydos, K., Güven, M. C., Can, B., y Ergün, A. (2001). Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. *BJU International*, 88(6), 622–626.
- Aziz, N., Said, T., Paasch, U., y Agarwal, A. (2007). *The relationship between human sperm apoptosis , morphology and the sperm deformity index*. 22(5), 1413–1419.
- Barati, E., Nikzad, H., y Karimian, M. (2020). Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(1), 93–113.
- Ben Maamar, M., Beck, D., Nilsson, E. E., Kubsad, D., y Skinner, M. K. (2021). Epigenome-wide association study for glyphosate induced transgenerational sperm DNA methylation and histone retention epigenetic biomarkers for disease. *Epigenetics*, 16(10), 1150–1167.
- Björndahl, L., Söderlund, I., y Kvist, U. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18(4), 813–816.
- Bromfield, J. J. (2014). Seminal fluid and reproduction: Much more than previously thought. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(6), 627–636.
- Budin, S. B., Kho, J. H., Lee, J. H., Ramalingam, A., Jubaidi, F. F., Latif, E. S., Zainalabidin, S., Taib, I. S., y Mohamed, J. (2017). Low-dose nicotine exposure induced the oxidative damage of reproductive organs and altered the sperm characteristics of adolescent male rats. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 24(6), 50–57.
- Carlson, B. M. (2000). *Embriología humana y biología del desarrollo*.
- Cebrián-Pérez, J. A., Casao, A., González-Arto, M., Dos Santos Hamilton, T. R., Pérez-Pé, R., y Muiño-Blanco, T. (2014). Melatonin in sperm biology: Breaking

- paradigms. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 11–21.
- Clair, E., Linn, L., Travert, C., Amiel, C., Séralini, G. E., y Panoff, J. M. (2012). Effects of roundup® and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Current Microbiology*, 64(5), 486–491.
- Cme, D. T. B. (2014). Nicotine and health. *Drug and Therapeutics Bulletin*, 52(7), 78–81.
- Condorelli, R. A., La Vignera, S., Giaccone, F., Iacoviello, L., Vicari, E., Mongioi, L., y Calogero, A. E. (2013). In vitro effects of nicotine on sperm motility and bio-functional flow cytometry sperm parameters. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 26(3), 739–746.
- Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61, 1–31.
- Ferramosca, A., Lorenzetti, S., Di Giacomo, M., Murrieri, F., Coppola, L., y Zara, V. (2021). Herbicides glyphosate and glufosinate ammonium negatively affect human sperm mitochondria respiration efficiency. *Reproductive Toxicology*, 99(November 2020), 48–55.
- Gavella, M., y Lipovac, V. (2000). Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Archives of Andrology*, 44(1), 23–27.
- Golan, R., Shochat, L., Weissenberg, R., Soffer, Y., Marcus, Z., Oschry, Y., y Lewin, L. M. (1997). Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: A flow cytometric assay using Acridine Orange staining. *Molecular Human Reproduction*, 3(1), 47–54.
- Gomes, M. P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., y Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4691–4703.
- Grunewald, S., Said, T. M., Paasch, U., Glander, H., y Agarwal, A. (2007). *Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity*. 325–330.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., y Cardinali, D. P. (2006). Melatonin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(3), 313–316.
- Huynh, T., Mollard, R., y Trounson, A. (2002). Selected genetic factors associated with

- male infertility. *Human Reproduction Update*, 8(2), 183–198.
- Kapoor, D., y Jones, T. H. (2005). Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *European Journal of Endocrinology*, 152(4), 491–499.
- Kareskoski, M., y Katila, T. (2008). Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 249–256.
- Karimfar, M. H., Niazvand, F., Haghani, K., Ghafourian, S., Shirazi, R., y Bakhtiyari, S. (2015). The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28(1), 69–76.
- Krausz, C. (2011). Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(2), 271–285.
- Li, C., Hao, H., Zhao, Y., Zhang, P., y Wang, H. (2019). *Melatonin Improves the Fertilization Capacity of Sex-Sorted Bull Sperm by Inhibiting Apoptosis and Increasing Fertilization Capacitation via MT1*. 1–19.
- López-Trinidad, B., Konigsberg, M., Ávalos, A., Rodríguez, A., Rodríguez, E., Retana, F., y Arenas, E. (2016). Apoptosis en espermatozoides. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(September), 23–27.
- Mahfouz, R. Z., Plessis, S., Ph, D., Aziz, N., Sharma, R., y Ph, D. (2010). Sperm viability , apoptosis , and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and Sterility*, 93(3), 814–821.
- Mahfouz, R. Z., Sharma, R. K., Said, T. M., Erenpreiss, J., y Agarwal, A. (2009). Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 91(4), 1110–1118.
- Miranda-Spooner, M., Paccola, C. C., Neves, F. M. O., de Oliva, S. U., y Miraglia, S. M. (2016). Late reproductive analysis in rat male offspring exposed to nicotine during pregnancy and lactation. *Andrology*, 4(2), 218–231.
- Mortimer, D. (2020). A technical note on the assessment of human sperm vitality using eosin–nigrosin staining. *Reproductive BioMedicine Online*, 40(6), 851–855.
- Moskovtsev, S. I., y Librach, C. L. (2013). *Methods of Sperm Vitality Assessment*. 927, 13–19.
- Müller, B. (2021). Glyphosate—A love story. Ordinary thoughtlessness and response-ability in industrial farming. *Journal of Agrarian Change*, 21(1), 160–179.

- Mutwedu, V. B., Nyongesa, A. W., Azine, P. C., Chiregereza, D. K., Ngoumtsop, V. H., Mugumaarhahama, Y., y Ayagirwe, R. B. B. (2021). Growth performance and reproductive function impairment of glyphosate-based herbicide in male guinea pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Medicine and Science*, 7(3), 1047–1055.
- Nerozzi, C., Recuero, S., Galeati, G., Bucci, D., Spinaci, M., y Yeste, M. (2020). Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9.
- O Duke, S., y B Powles, S. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 63(11), 1100–1106.
- Oliva, A., Spira, A., y Multigner, L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction*, 16(8), 1768–1776.
- OMS. (2001). Recolección y examen del semen humano. In *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*.
- Ortega-Ferrusola, C., Gil, M. C., Rodríguez-Martínez, H., Anel, L., Peña, F. J., y Martín-Muñoz, P. (2017). Flow cytometry in Spermatology: A bright future ahead. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 921–931.
- Ortiz, A., Espino, J., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., García, J. F., Pariente, J. A., y Rodríguez, A. B. (2011). High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *Journal of Pineal Research*, 50(2), 132–139.
- Oyeyipo, I. P., Raji, Y., Emikpe, B. O., y Bolarinwa, A. F. (2011). Effects of nicotine on sperm characteristics and fertility profile in adult male rats: A possible role of cessation. *Journal of Reproduction and Infertility*, 12(3), 201–207.
- Pham, T. H., Derian, L., Kervarrec, C., Kernanec, P. Y., Jegou, B., Smagulova, F., y Gely-Pernot, A. (2019). Perinatal exposure to glyphosate and a glyphosate-based herbicide affect spermatogenesis in mice. *Toxicological Sciences*, 169(1), 260–271.
- Reiter, R. J. (2003). Melatonin: Clinical relevance. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(2), 273–285.
- Rodríguez Pendás, B. V. (2017). Fragmentación del ADN espermático e infertilidad masculina. *Revista Cubana de Endocrinología*, 28(3), 1–17.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R., y Thomas, A. J. (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a

- prospective study. *Fertility and Sterility*, 78(3), 491–499.
- Sarabia, L., Maurer, I., y Bustos-Obregón, E. (2009). Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 663–668.
- Schrott, R., Rajavel, M., Acharya, K., Huang, Z., Acharya, C., Hawkey, A., Pippen, E., Lyster, H. K., Levin, E. D., y Murphy, S. K. (2020). Sperm DNA methylation altered by THC and nicotine: Vulnerability of neurodevelopmental genes with bivalent chromatin. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12.
- Shafik, A., Shafik, A. A., Shafik, I., Sibai, O. El, y El-kom, S. (2006). *Sperm dna fragmentation*. 197–208.
- Tan, D., Reiter, R., Manchester, L., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R., Mayo, J., Kohen, R., Allegra, M., y Hardelan, R. (2005). Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2), 181–197.
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., y Aparicio, I. M. (2012). The Membrane of the Mammalian Spermatozoa: Much More Than an Inert Envelope. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.3), 65–75.
- Tsui, M. T. K., y Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189–1197.
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., y Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616–617, 255–268.
- Villas, B. H. (1998). Flow cytometry: an overview. *Cell Vision : The Journal of Analytical Morphology*, 5(1), 56–61.
- Wathes, D. C., Abayasekara, D. R. E., y Aitken, R. J. (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 77(2), 190–201.
- Zhao, F., Whiting, S., Lambourne, S., Aitken, R. J., y Sun, Y. pu. (2021). Melatonin alleviates heat stress-induced oxidative stress and apoptosis in human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, 164(August 2020), 410–416.