



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estudio de los procesos oxidativos asociados con la capacitación espermática y su impacto sobre la fragmentación de ADN.

Alumno: Olga González Toral

Julio, 2016



Trabajo Fin de Grado

Estudio de los procesos oxidativos asociados con la capacitación espermática y su impacto sobre la fragmentación de ADN.

Alumno: Olga González Toral

Julio, 2016

INDICE:

- Resumen (Abstract): Páginas 4-5.
- Introducción (Antecedentes): Páginas 5-10.
- Materiales y Métodos: Páginas 11-18.
 - *Grupos experimentales: Página 12.
 - *Estudio microscópico: Páginas 12-14.
 - *Estudio de la fragmentación de ADN: Páginas 14-16.
 - *Citometría de flujo: Páginas 16-18.
- Resultados: Páginas 18-35.
 - *Estudio microscópico: Páginas 18-21.
 - *Estudio de la fragmentación de ADN: Páginas 22-24.
 - *Citometría de flujo: Páginas 25-35.
 - Estudio de las alteraciones de membrana: Páginas 25-28.
 - Estudio ROS: Páginas 28-31.
 - Estudio de envejecimiento celular y apoptosis: Páginas 32-35.
- Discusión: Páginas 35-38.
- Conclusión: Páginas 38-39.
 - *Estudio microscópico: Página 38.
 - *Estudio de la fragmentación de ADN: Página 38.
 - *Citometría de flujo: Página 38.
 - *Conclusión final: Páginas 38-39.
- Referencias (Bibliografía): Páginas 39-41.

RESUMEN:

El espermatozoide es una célula especializada única en su morfología, función y estructura.

Los espermatozoides de mamíferos deben experimentar el proceso de reacción acrosómica antes de poder fecundar a los ovocitos y esto conlleva el proceso de capacitación espermática.

La fragmentación de ADN es una importante causa de infertilidad.

Debido a su metabolismo aeróbico, los espermatozoides generan bajos niveles de ROS; cuando se produce exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), se daña la membrana espermática y esta pierde fluidez e integridad, esto es debido a que los espermatozoides pierden su capacidad para participar en los eventos de fusión de membrana asociados con la fecundación.

Con este estudio se pretende investigar el proceso oxidativo que se asocia con la capacitación espermática y el impacto que produce en la fragmentación del ADN sobre la función de los espermatozoides. Se analizarán diferentes parámetros con diferentes técnicas y se observará como varía cada uno de estos parámetros del espermatozoide fresco al espermatozoide congelado; con esto se pretenden evitar problemas en las técnicas de reproducción asistida.

Se elaborará un análisis con espermatozoide fresco y congelado donde se tratarán diferentes parámetros: motilidad (en fresco es buena, en congelado nula), morfología (es correcta en ambos), vitalidad (es buena en fresco y en congelado es baja), fragmentación de ADN (el porcentaje en ambos es alto), integridad de la membrana (el porcentaje es bajo en fresco y normal en congelado), ROS (el porcentaje en fresco es medio y es alto en congelado), envejecimiento celular (el porcentaje es más alto en fresco que en congelado).

Se llegará a la conclusión de que la congelación afecta a la mayoría de los parámetros analizados, y la solución a esto sería buscar criopreservadores más efectivos y con los que no se vieran dañados los espermatozoides para intentar que las técnicas de reproducción asistida sean lo más efectivas posibles.

ABSTRACT

The sperm is a unique specialized cell in its morphology, function and structure.

Mammalian sperm undergo the acrosome reaction process before they can fertilize oocytes and this entails the process of sperm capacitation.

DNA fragmentation is a major cause of infertility.

Because of their aerobic metabolism, sperm generate low levels of ROS; when excess ROS occurs, the sperm membrane is damaged and it loses fluidity and integrity, this is because the sperm lose their ability to participate in events associated membrane fusion with fertilization.

This study aims to investigate the oxidative process associated with sperm capacitation and the impact it has on DNA fragmentation of sperm function. Different parameters were analyzed with different techniques and observe how they vary each of these parameters sperm, fresh to frozen sperm; with this it is to avoid problems with fertility.

An analysis with in fresh and frozen where different parameters are treated to be drawn: motility (fresh is good, null frozen), morphology (is correct in both), vitality (it is good fresh and frozen is low), DNA fragmentation (the % in both is high), membrane integrity (the % is low in fresh but frozen is good), ROS (the % fresh is medium but frozen is high), cell cycle (the % it is higher in fresh than frozen).

It reached the conclusion that freezing affects most of the parameters analyzed, and the solution to this would look more effective crioprotectors and the sperm would not show damaged to try that fertility techniques are the most effective possible.

INTRODUCCION

El ADN contiene la información genética y tiene la capacidad de copiarse a sí mismo mediante la replicación; está constituido por dos cadenas de nucleótidos asociados entre sí por puentes de hidrógeno; tiene como azúcar una pentosa y es desoxirribosa; presenta cuatro bases nitrogenadas: Adenina, Guanina, Timina y Citosina (Peinado M.A., Pedrosa J.A., Aranda F., et al., 1996).

El espermatozoide es una célula especializada, única en su morfología, en la estructura de la cromatina y en su función. Esta célula, se forma a través del proceso de espermatogénesis que se caracteriza por una serie de cambios durante la diferenciación espermática. Estos cambios, se pueden diferenciar en: proliferación mitótica, recombinación mitótica y segregación de cromosomas. El resultado final son espermatozoides maduros que son esenciales para la reproducción, fecundación y desarrollo embrionario normal (Ioannou D., Miller D., Griffin D.K., et al., 2015).

Los espermatozoides de mamíferos, deben experimentar el proceso de reacción acrosómica antes de poder fecundar a los ovocitos. El desarrollo de la capacidad de los espermatozoides para llevar a cabo la reacción acrosómica, necesita una serie de cambios que son el denominado proceso de capacitación espermática (Yanagimachi R., 1988).

El proceso de capacitación espermática, hace que la célula pueda unirse a la zona pelúcida, y de este modo, experimente la reacción acrosómica y exprese hipermotilidad; esto es, un movimiento especial que permite al espermatozoide desplazarse y llegar a la zona pelúcida (Yanagimachi R., 1988).

Durante la reacción acrosómica se produce la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en varios sitios, formando vesículas, que se desprenden de la cabeza del espermatozoide y se libera el contenido del acrosoma y así entran finalmente en el ovocito (Langlais J., Roberts K. D., 1985).

La fragmentación del ADN, es una importante causa de infertilidad. Muchos estudios indican que si la fragmentación del ADN espermático supera el 30%, el embarazo no se podrá llevar a cabo (Fernandez J.L., Muriel L., Rivero M.T, et al., 2003).

La presencia de ADN dañado en espermatozoides eyaculados se asocia con una serie de resultados clínicos adversos, incluyendo infertilidad (Agarwal A., Said T.M., 2003).

El daño del ADN en el espermatozoide puede llevar a que se formen mutaciones en la próxima generación o puede dar lugar a infertilidad (Ramzam M.H., Ramzam M., Khan M.M., et al., 2015).

Debido a su metabolismo aeróbico, los espermatozoides generan bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen el anión superóxido de hidrógeno, radicales hidropéroxilo y radicales hidroxilo (Aitken R.J., 1995).

Altos niveles de especies reactivas de oxígeno generados por la infiltración de espermatozoides anormales o leucocitos puede alterar el mecanismo de defensa antioxidante del plasma seminal, y esto conduce al daño de ADN y a la peroxidación de la membrana plasmática (Aitken R.J., Clarkson J.S., 1987).

La capacidad potencial del estrés oxidativo para alterar la competencia funcional de los espermatozoides fue reconocida por primera vez por MacLeod en 1943, lo que hizo fue grabar el impacto negativo sobre las tensiones de oxígeno en la motilidad espermática (Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al., 1998).

Parece ser que los radicales libres, se generan a causa de un exceso de citoplasma residual que los espermatozoides retienen durante las etapas finales de espermatogénesis (Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al.,1998).

Cuando se produce exceso de ROS, sobre todo de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generado por ataque del sistema oxidasa del espermatozoide, se daña la membrana espermática y esta pierde fluidez e integridad como resultado de que los espermatozoides pierden su capacidad para participar en los eventos de fusión de membrana asociados con la fecundación (Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al.,1998).

Aparte de los efectos citotóxicos de las ROS generados a partir de fuentes intracelulares, los espermatozoides también pueden ser dañados por metabolitos de oxígeno tóxicos generados por los leucocitos infiltrados en el eyaculado (Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al.,1998).

Las especies ROS, aparte de producir daños en la membrana plasmática de los espermatozoides, también atacan al ADN, induciendo roturas de la cadena y el daño oxidativo en los espermatozoides. A pesar de la prevalencia de daño oxidativo del ADN en los espermatozoides, no se sabe si esas células dañadas son capaces de fertilizar (Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al.,1998).

Los datos existentes sobre la relación entre el daño del ADN y la calidad del semen son confusos. Thus, Hughes, et al., compararon pacientes astenozoospermicos con normozoospermicos y descubrieron que no había diferencias en el daño del ADN en la línea base de los espermatozoides. Sun et al, observaron que había correlaciones negativas entre la fragmentación del ADN y la calidad del semen en cuanto a motilidad, morfología y conteo. Aravindan et al., encontraron una fuerte correlación entre las roturas de la cadena y la susceptibilidad de los espermatozoides al desnaturizar su ADN a bajo PH, esta correlación también es negativa con respecto al potencial de fertilización de los espermatozoides (Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al.,1998).

Cuando un espermatozoide se somete a estrés oxidativo, la membrana y la integridad del ADN están amenazadas. Que este espermatozoide sea competente o no para fecundar el oocito, dependerá de la velocidad a la que se pierda la integridad del ADN y los componentes individuales de la función del espermatozoide después de un estrés oxidativo (Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al.,1998).

Se sabe, que la motilidad del espermatozoide competente para someterse a la reacción del acrosoma, la capacidad de fusionarse con el oocito y la integridad del ADN son susceptibles a daño (Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al.,1998).

Las anomalías en el genoma caracterizado por el ADN dañado, pueden ser indicativas de una disminución en la fertilidad del macho, independientemente de los parámetros del semen de rutina. El semen de mala calidad se ha asociado con un aumento en la proporción de ADN espermático fragmentado (Sharma R.K., Said T., Agarwal A.,2004).

Los espermatozoides, son propensos a desarrollar diferentes formas de alteraciones mitocondriales de ADN (ADNmt) que incluyen delecciones, mutaciones puntuales y poliformismo. Estas anomalías se han asociado con una disminución en la calidad del semen, motilidad y fertilidad. El ADN mitocondrial, carece de las histonas que ayudan a proteger contra el daño y se cree que tiene solamente un mecanismo de reparación de base (Sharma R.K., Said T., Agarwal A.,2004).

Hay tres factores que pueden estar implicados en la etiología de las lesiones del ADN en la línea germinal: el estrés oxidativo, las deficiencias en los procesos naturales y la apoptosis abortiva (Sharma R.K., Said T., Agarwal A.,2004).

El estrés oxidativo, se produce por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante. Los espermatozoides tienen dos mecanismos de defensa contra el ataque oxidativo del ADN: la disposición del empaquetado del ADN y el plasma seminal (Sharma R.K., Said T., Agarwal A.,2004).

Las ROS, pueden conducir a la cromatina de reticulación, roturas de la cadena de ADN, oxidación en las bases del ADN, delecciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas, etc. El estrés oxidativo también se ha relacionado con la apoptosis (Sharma R.K., Said T., Agarwal A.,2004).

Los espermatozoides inmaduros tienen altos niveles de daño del ADN y de producción de ROS y es probable que tengan alteraciones en la cromatina. La fragmentación del ADN se caracteriza por roturas en el ADN, que son detectadas en eyaculados subfértiles (Sharma R.K., Said T., Agarwal A.,2004).

El estrés oxidativo, provoca la peroxidación lipídica (LPO), que aumenta la permeabilidad de la membrana y permite que algunos elementos puedan pasar a través de esta alterando el estado metabólico de la célula (Storey B.T., 1997).

Un mal funcionamiento de las mitocondrias espermáticas, puede ser una fuente importante de estrés oxidativo, por eso, también se investigó la producción de ROS mitocondriales (Balao C. M., Ortega C., Morrell J. M., et al, 2016).

Aparte de las pruebas tradicionales para evaluar la integridad genética de una muestra de semen, tales como concentración, motilidad, morfología, etc, existen varias técnicas de genética molecular (Ioannou D., Miller D., Griffin D.K., et al.,2015).

La congelación, como se observará en el estudio, afecta a la calidad del espermatozoide en multiples parámetros, como motilidad, vitalidad, formación de ROS, daño de membrana y envejecimiento celular.

Hay numerosas pruebas para medir la fragmentación de ADN y otros daños espermáticos (Fernandez J.L., Muriel L., Rivero M.T, et al., 2003). En este experimento se han utilizado algunos de los fluorocromos y otros elementos descritos a continuación; más adelante se explicará detalladamente como se ha realizado el experimento.

La 2,7-Diclorofluoresceína es un indicador de fluorescencia que se usa para medir especies reactivas de oxígeno (ROS), a más fluorescencia producida más ROS tendrá la muestra, este indicador siempre ha de mantenerse en oscuridad porque se va revelando con la luz (Lebel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C., 1992).

La Merocianina 540 (M 540), es un colorante fluorescente, de color intenso, este colorante se utiliza para medir la integridad de la membrana, a más fluorescencia, más daño de membrana habrá, más colorante ingresará en la célula (Sieber F, 1987).

El Yoduro de propidio es un fluorocromo que no pasa a través de las membranas celulares intactas, pero se fija a los núcleos de las células degeneradas (Garner D. L., Pinkel, D., Johnson, L., A., et al, 1986), el Yoduro de propidio tiñe casi de forma inmediata los espermatozoides de verraco y de otras especies (Miyazaky R., Fukuda M., Takeuchi H., et al, 1990).

El Ácido ursólico es un compuesto que se encuentra en varias especies vegetales, entre sus múltiples efectos biológicos se encuentra el de anticancerígeno, o criopreservador (Liu J., 1995); en este experimento se utilizará como antioxidante (Criopreservador), al añadirlo se intentará disminuir el número de ROS.

El Glutatión (GSH), es un tripéptido no proteínico, tiene varias funciones, entre ellas la de ser el principal antioxidante de las células, es un protector de los radicales

libres y ayuda a protegerlas de las especies reactivas de oxígeno (ROS); el Glutatión se puede encontrar en forma oxidada, como disulfuro de glutatión (GSSG) o en forma reducida. En las células se suele encontrar de forma reducida y para este experimento se va a utilizar de esta manera; se observarán los efectos que tiene sobre la muestra congelada y se intentarán paliar los efectos negativos que tiene la congelación sobre el espermatozoide con respecto a las ROS (Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., et al., 2003).

La citometría de flujo es una técnica que sirve para conteo celular, en este caso se va a utilizar para valorar la apoptosis y el envejecimiento celular de la muestra medida, así como para valorar daños en la membrana y para observar especies reactivas de oxígeno; con la citometría de flujo se separan las poblaciones de interés para nuestro estudio (Moncrieffe H.).

La citometría de flujo es una técnica muy potente que permite analizar múltiples parámetros en una célula (Moncrieffe H.).

El citómetro hace pasar las células de una en una a través de un láser, detecta la fluorescencia y cómo dispersan la luz, almacenando esa información para próximos análisis. Hay varios tipos de láseres y varios fluorocromos (Moncrieffe H.).

La mayoría de los citómetros, recogen la luz que se dispersa al pasar por la célula y la que emiten los espermatozoides cuando se unen a los receptores fluorescentes (Matas C., 1997).

La principal ventaja que presenta la citometría de flujo con respecto a otras técnicas, es que puede medir varios parámetros de miles de células individuales en pocos minutos (Matas C., 1997).

El ciclo celular tiene varias fases: G0, G1, S, G2, M, en él se pueden observar aneuploidías y poliploidías (Lodish H., Berk, Matsudaira, et al., 2005); para ver el envejecimiento celular que han sufrido los espermatozoides se observará cómo los tratamientos afectan a las células, si como respuesta al daño se dividen, si se para el ciclo o si se observa muerte celular, en este caso, apenas habrá daño celular, pero sí habrá muchas especies reactivas de oxígeno (ROS).

El objetivo de este estudio es investigar el proceso oxidativo que se asocia con la capacitación espermática y el impacto que produce en la fragmentación del ADN y sobre la función de los espermatozoides. Se analizarán especies reactivas de oxígeno (ROS), integridad de la membrana y envejecimiento celular o apoptosis, y

se observará como varían cada uno de estos parámetros del esperma fresco al esperma congelado; esto debe ser conocido para que las técnicas de reproducción asistida sean lo mas efectivas posibles.

MATERIALES Y METODOS

Para realizar estos experimentos se ha utilizado semen de verraco, tanto en muestras en fresco como en muestras congeladas, se han utilizado diferentes tratamientos, diferentes fluorocromos y diferentes técnicas.

Los colorantes y fluorocromos utilizados han sido:

- Merocianina 540 (M540).
- 2,7-Diclorofluoresceína.
- Yoduro de propidio.
- Tinción eosina-nigrosina.

Los tratamientos utilizados han sido:

- Ácido ursólico.
- Glutación reducido (GSH reducido).

Los medios de cultivo para los espermatozoides utilizados han sido:

- F10 Nutrient Mixture (Ham) (1x).
- Glicerol.

Para los fluorocromos Merocianina 540 y 2,7-Diclorofluoresceína se añadirán 0,00569g/10ml de agua destilada y 0,000125g/50ml de etanol absoluto respectivamente (Martinez J.C., García A., Gumbao D., et al., 2011).

Para el tratamiento de Ácido ursólico se han añadido 0,00022g/50ml de agua destilada.

Se van a preparar muestras en fresco y muestras congeladas, para ello se utilizará 1ml de semen con medio, 50µl de GSH reducido y otros 50µl de ácido ursólico; esto se sabe porque se observará al microscopio una muestra de 20µl de esperma teñido con hematosilina-eosina, y así se determinará cuanta cantidad se va a echar, y al observar se decide echar 100µl de esperma, 900µl del medio, en total 1ml (1000µl),

y después a todo esto se le añadirá el tratamiento correspondiente siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

GRUPOS EXPERIMENTALES:

MUESTRAS CONGELADAS			
Muestra 1	Esperma	Medio F10	Glicerol
	100 µl	800 µl	100 µl
Muestra 2	Esperma	Medio F10	GSH
	100 µl	900 µl	50 µl
Muestra 3	Esperma	Medio F10	Ácido ursólico
	100 µl	900 µl	50 µl
MUESTRAS EN FRESCO			
Muestra 4	Esperma	Medio F10	
	100 µl	900 µl	
Muestra 5	Esperma	Medio F10	GSH
	100 µl	900 µl	50 µl
Muestra 6	Esperma	Medio F10	Ácido ursólico
	100 µl	900 µl	50 µl

El Glicerol se le echa solo a las muestras congeladas porque es un criopreservador y las protegerá de la congelación.

El GSH y el Ácido ursólico se dejará actuar una hora en las muestras tanto antes de congelarlas como antes de echarles los fluorocromos.

Para descongelar las muestras:

- Primero hay que sacarlas del congelador y meterlas en el baño durante cinco minutos a 37°C.
- Después, centrifugar 5 minutos a 800 rpm.
- Retirar el sobrenadante.
- Rellenar de Medio F10 hasta 1ml y meter en la estufa durante una hora a 32°C.

ESTUDIO MICROSCOPICO:

Se ha realizado también el análisis de vitalidad, morfología y movilidad tanto de esperma en fresco como de esperma congelado.

El protocolo a seguir es el siguiente:

Se contarán 200 espermatozoides y sobre esos 200, se calcularán diferentes porcentajes:

- Vitalidad.
- Morfología.
- Motilidad o movilidad.

Tinción y metodología:

- Se le añaden 50µl de eosina- nigrosina a 50 µl de semen, se mezclan bien en un tubo Eppendorf.
- Se esperan 30 segundos a temperatura ambiente, y se echan 12µl de la mezcla a un portaobjetos, después de esto, se realiza un frotis.
- Dejar secar al aire el frotis.
- Colocar una gota de medio de montaje DPX y cubrir con un cubreobjetos.
- Examinar al microscopio con aceite de inmersión.

La tinción eosina- nigrosina se realiza de la siguiente manera:

- Disolver 0,67 gramos de eosina y 0,90 gramos de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de vidrio colocado en una placa caliente de agitación.
- Calentar y añadir 10 gramos de nigrosina, disolver y dejar enfriar.

Evaluación de la vitalidad y la morfología:

La vitalidad y la morfología se pueden evaluar en la misma muestra, para ello se coge un tubo Eppendorf y en el se mezclan 50µl de semen con 50µl de eosina-nigrosina, de este tubo se coge una gota de 12µl y se hace un frotis, una vez seco, se coloca una gota de medio de montaje DPX y se le pone un cubreobjetos encima, posteriormente, se observa al microscopio con aceite de inmersión.

Se contarán 200 espermatozoides tanto para la vitalidad como para la morfología; en el caso de la vitalidad se contarán tanto vivos como muertos, recordando que los teñidos son los muertos y los no teñidos son los vivos.

Movilidad o motilidad:

Esta prueba se realiza sin teñir.

Se añade a un portaobjetos caliente una gota de semen, que estará en la estufa para que no pierda su movilidad y se le pone un cubreobjetos encima, posteriormente se observa al microscopio, con el objetivo de 20-40x.

ESTUDIO DE LA FRAGMENTACION DE ADN:

También se ha realizado una prueba para ver la fragmentación del ADN en el esperma (Halotech. Halosperm G2, protocolo), esta se explica a continuación:

Este kit contiene:

- Un tubo con agarosa.
- Portas especiales para este kit.
- Solución 1; es una solución desnaturalizante.
- Solución 2; es una solución de lisis.
- Solución 3; es una solución color.
- Solución 4; es una solución color.

Antes de empezar los pasos del kit hay que tener en cuenta que hay que preparar el siguiente material:

- Baño de incubación a 100°C.
- Preparar etanol al 100%.
- Preparar etanol al 70%.
- Preparar el control.
- Preparar las muestras.

El control será esperma fresco.

Las muestras que se utilizarán para realizar el kit son las siguientes:

Muestras congeladas:

1. Esperma + Medio F10 + Glicerol.
2. Esperma + Medio F10 + Glutación reducido (GSH).
3. Esperma + Medio F10+ Ácido ursólico.

Muestras en fresco:

4. Esperma + Medio F10.
5. Esperma+ Medio F10 + Glutación reducido (GSH).
6. Esperma + Medio F10 + Ácido ursólico.

A continuación, se describe como realizar el protocolo:

- Colocar la agarosa dentro del baño a 100°C durante 5 minutos para que se vuelva líquida, ya que a temperatura ambiente es sólida.
- Coger los cuatro Eppendorf que se van a utilizar y echarles 100 µl de agarosa a cada uno y mantener en el baño a 100°C durante 5 minutos, después, bajar la temperatura a 37°C durante 5 minutos. (Esto también se hará con la muestra control)
- Echar 50 µl de la muestra a cada uno de los Eppendorf donde estan los 100 µl de agarosa y mezclar bien, mantener a 37°C los tubos para que la agarosa no se solidifique. (Esto se hará en las muestras experimentales y en la muestra control).
- Colocar 8 µl de la mezcla hecha en el paso anterior en un porta de los que trae el kit y ponerle un cubre, presionar suavemente; hacer esto en cada una de las muestras y en el control. (Esto se hará en las muestras experimentales y en la muestra control).
- Colocar en frío los portas, encima de las placas de Petri preparadas previamente y llevar al frigorífico a 4°C durante 5 minutos para que la agarosa se solidifique. (Este paso se realizará tanto en las muestras experimentales como en la muestra control).

- Sacar las muestras del frigorífico y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos, pasado este tiempo, retirar el cubreobjetos. (Este paso se realizará tanto en las muestras experimentales como en la muestra control).
- Aplicar la solución 1 a cada una de las muestras, cubriendo bien e incubar durante 7 minutos, pasado ese tiempo, retirar el exceso poniendo el porta en posición vertical. (Esto solo se realizará en las muestras experimentales).
- Aplicar la solución 2 a cada una de las muestras cubriéndolas bien e incubar durante 20 minutos, retirar el sobrenadante poniendo el porta en posición vertical. (Este paso se realizará en las muestras experimentales y en la muestra control).
- Lavar cada muestra 5 minutos con agua destilada, quitar el sobrante poniendo el porta en vertical, después, deshidratar las muestras con etanol al 70% durante 2 minutos, una vez hecho esto, quitar el sobrante y añadir etanol al 100% durante 2 minutos. (Hacer esto sobre la muestra control y las muestras experimentales).
- Aplicar la solución 3 a todas las muestras y cubrir bien, esperar 7 minutos y quitar lo sobrante poniendo el porta en posición vertical, después, aplicar la solución 4 a todas las muestras y cubrir bien, incubar durante 7 minutos y retirar poniendo el porta en posición vertical y dejarlas a temperatura ambiente. (Esto se hará tanto en la muestra control como en las muestras experimentales).
- Observar las muestras experimentales y la muestra control con el microscopio.
- Por último, interpretar los resultados calculando el % de esperma con ADN fragmentado a traves de la siguiente fórmula:

$$SDF(\%) = \frac{(\text{ADN Fragmentado} + \text{ADN Degradado})}{\text{Total de celulas contadas}} \times 100$$

CITOMETRIA DE FLUJO:

Una vez descongeladas y listas para analizar, cada una de las muestras, tanto las congeladas como las frescas, llevarán 2,7 µl de Merocianina 540 y de 2,7-Diclorofluoresceína y 10 µl de Yoduro de propidio; para cada uno de los fluorocromos hay que preparar las seis muestras.

El Yoduro de propidio tiene un protocolo especial de preparación, que se explica a continuación; para realizarlo se siguió el método de Doyle con ligeras modificaciones (Doyle et al., 1995):

- Centrifugar 5 minutos a 800 rpm.
- Quitar el sobrenadante (Que es el medio de cultivo).
- Añadir 500µl de alcohol de 70°, y dejar actuar durante 1 hora a 4° o 30 minutos a temperatura ambiente, en este caso, se ha mantenido 1 hora a 4°C.
- Después de este tiempo, volver a centrifugar 5 minutos a 800 rpm.
- Retirar el alcohol lavando con PBS (1x), para ello, se resuspende el pellet en 250µl de PBS (1x) y se añaden 5µl de ARNasa (10mg/ml), se incuba a 32° durante 30 minutos.
- Por último, añadir 10µl de Yoduro de propidio y completar con PBS hasta 1ml (900µl).
- Mantener en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Todos los fluorocromos deberán permanecer en oscuridad, ya que si no se mantienen así, se revelan y van perdiendo fluorescencia; el Yoduro antes de ser medido deberá estar 30 minutos en la muestra, en cambio la Merocionina y la Diclorofluoresceína deberán permanecer 20 minutos en la muestra antes de ser llevados a citómetro.

El procedimiento para utilizar el citómetro de flujo es el siguiente: Primero se le pasa un control al aparato y se ajusta el citómetro al tamaño y forma de las células y así se puede ver donde se encuentra la población que se está buscando en este caso; el aparato presenta un láser que cuenta y lee todas y cada una de las células de la muestra y las separa por tamaño, esto también se utiliza para evitar falsos positivos;

lo que nos permitirá desechar los espermatozoides que no estén completos, cabezas o colas libres y seleccionar la población donde haya espermatozoides integros para así evitar las interferencias a la hora de medir; en la zona donde están las células se observará cuales emiten fluorescencia y dependiendo de esto y del tipo del tratamiento podremos observar diferentes parámetros:

- Yoduro de propidio: Sirve para observar en que fase del ciclo celular se encuentran las células de la muestra y así cuantificar envejecimiento celular o apoptosis; a más fluorescencia, mas envejecimiento celular o apoptosis habrá en la muestra.
- Merocianina 540: Sirve para observar alteración en la membrana; a más fluorescencia, más daño y más modificada se encuentra la membrana.
- 2,7-Diclorofluoresceína: Sirve para observar especies ROS, a más fluorescencia, más especies ROS habra en la muestra.

Los datos del citómetro son los siguientes:

Modelo: LSRFORTESSA

Fabricante: BD

Láser: Blue 488 nm

Red 640 nm

Violet 405 nm

Detectores: 16 (14 colores + SSC y FSC).

RESULTADOS

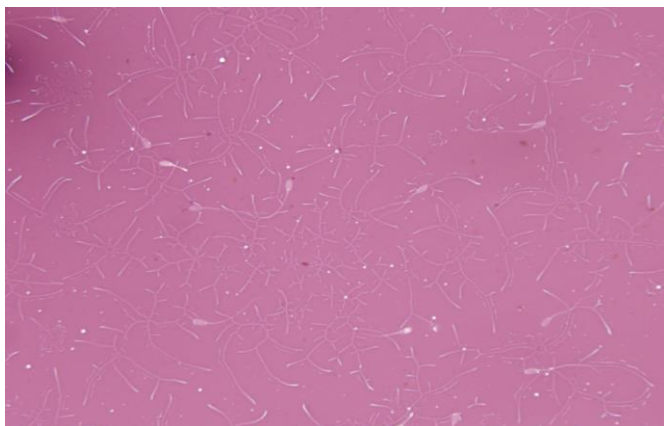
ESTUDIO MICROSCOPICO:

Resultados de la vitalidad, motilidad y morfología del esperma, tanto en fresco como en congelado:

Los resultados obtenidos serán los siguientes:

- Los espermatozoides vivos aparecerán sin teñir, esto significa que tienen su membrana intacta.
- Los espermatozoides muertos aparecerán teñidos de un color intenso, esto significa que su membrana está dañada.
- El valor óptimo para evaluar la vitalidad con la tinción eosina- nigrosina, es del 58%.

Se contarán 200 espermatozoides tanto para la vitalidad como para la morfología; en el caso de la vitalidad se contarán tanto vivos como muertos, recordando que los teñidos son los muertos y los no teñidos son los vivos.



Esperma en fresco vivo.

Resultados de una muestra de esperma control:

Evaluación de la *vitalidad, la morfología y motilidad o movilidad*:

VITALIDAD	Espermatozoides	% n=200
Vivos	197	0,98
Muertos	3	0,015
MORFOLOGIA		
Cola corta	14	0,07
Normales	186	0,93
MOVILIDAD		
Móviles	183	91,5
Inmóviles	17	8,5

La vitalidad es correcta porque supera el 58%.

La morfología es correcta.

La motilidad se realiza sin teñir; también se contarán 200 espermatozoides tanto móviles como inmóviles; la motilidad también es correcta.

Para las siguientes muestras también se contarán 200 espermatozoides:

Muestras congeladas:

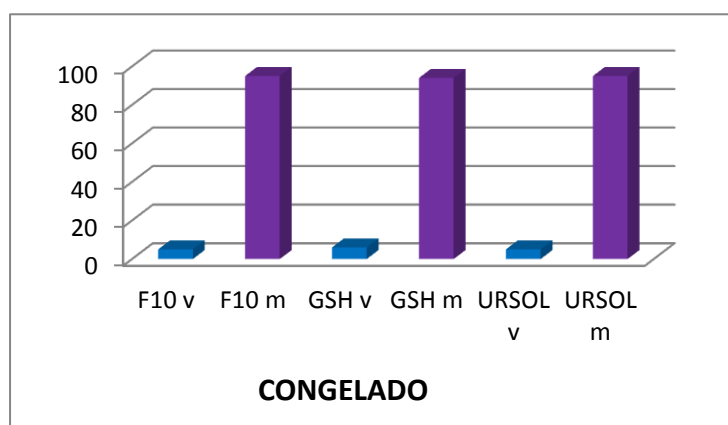
	VITALIDAD		MOVILIDAD		MORFOLOGIA		
n=200	vivos	muertos	móviles	inmóviles	cola corta	sin cola	normales
F10	10/200=5%	190/200=95%	0/200=0%	100/200=100%	0/200=0%	2/200=1%	198/200=99%
GSH	12/200=6%	188/200=94%	0/200=0%	100/200=100%	0/200=0%	4/200=2%	196/200=98%
Ursólico	10/200=5%	190/200=95%	0/200=0%	100/200=100%	0/200=0%	4/200=2%	196/200=98%

Se observa que la vitalidad es muy baja, la movilidad es nula y la morfología es correcta.

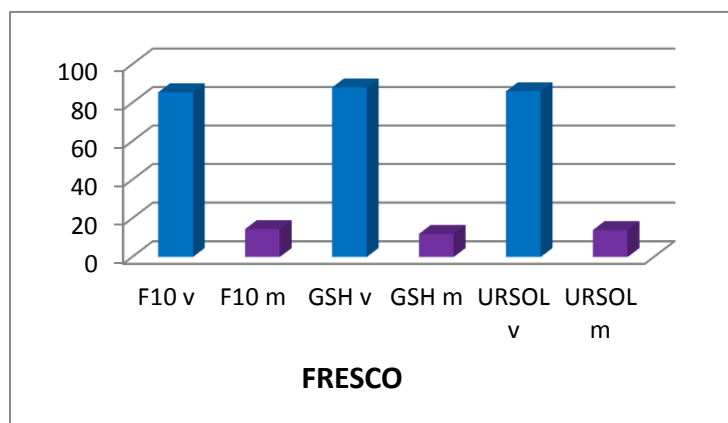
Muestras en fresco:

	VITALIDAD		MOVILIDAD		MORFOLOGIA		
n=200	vivos	muertos	móviles	inmóviles	cola corta	sin cola	normales
F10	171/200=85,8%	29/200=14,5%	110/200=55%	90/200=45%	1/200=0,5%	2/200=1%	197/200=98,5%
GSH	176/200=88%	24/200=12%	80/200=40%	120/200=60%	1/200=0,5%	0/200=0%	199/200=99,5%
Ursólico	172/200=86%	28/200=14%	115/200=57,5%	85/200=42,5%	1/200=0,5%	0/200=0%	199/200=99,5%

Se observa que la vitalidad es correcta ya que supera el 58%, la motilidad en la muestra que solo contiene medio (F10) es media, en la muestra con GSH es baja y en la muestra con Ácido ursólico es correcta y la morfología es correcta.

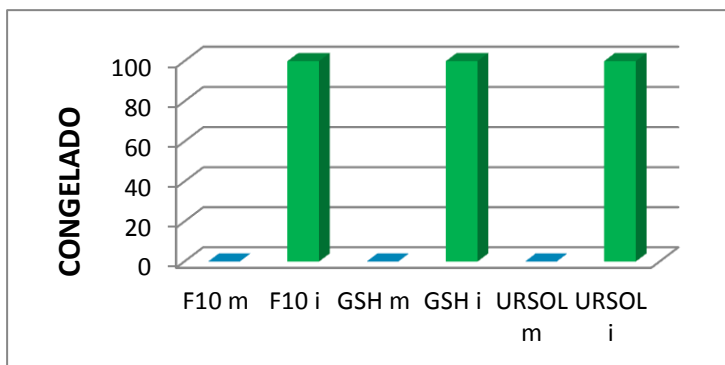


La vitalidad es muy baja en las tres muestras ya que el porcentaje de espermatozoides vivos no supera el 6% en ninguna muestra, la vitalidad si se ve afectada con el proceso de congelación.

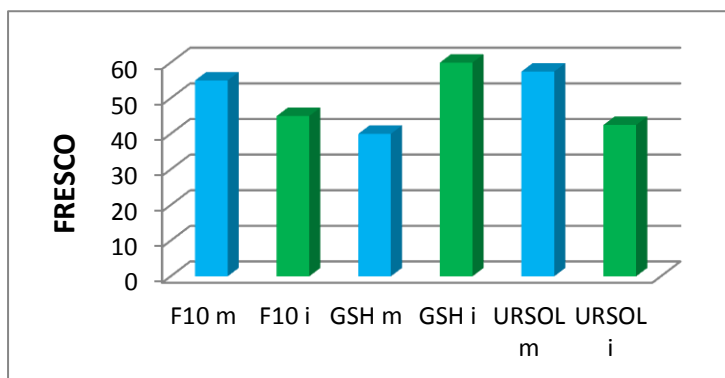


La vitalidad es alta, ya que en ninguna de las muestras hay un % menor al 85%, las muestras en fresco mantenidas en estufa a temperatura constante tienen una vitalidad alta, sin embargo, con el paso de los días esta se irá perdiendo y por tanto es conveniente analizar o manipular la muestra cuanto antes.

Comparación de la vitalidad de las muestras congeladas y frescas; los resultados estan expresados en %; en color azul se indican los individuos vivos y en morado los muertos; las siglas indican la muestra de la que se trata (F10, GSH, Ácido ursólico).

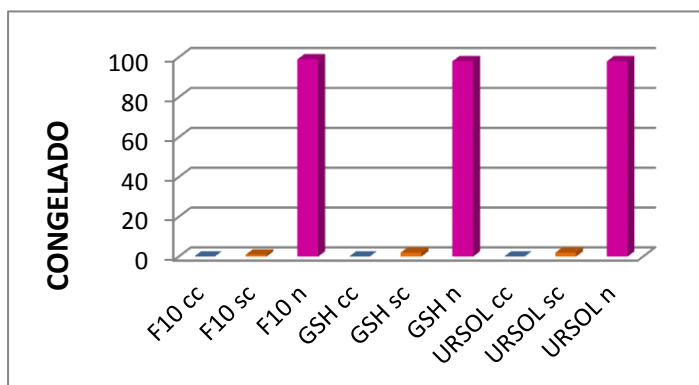


La motilidad espermática es totalmente nula ya que en todos los casos todos los espermatozoides observados son inmóviles, a la vista de los resultados observados, la congelación afecta a la movilidad de los espermatozoides.

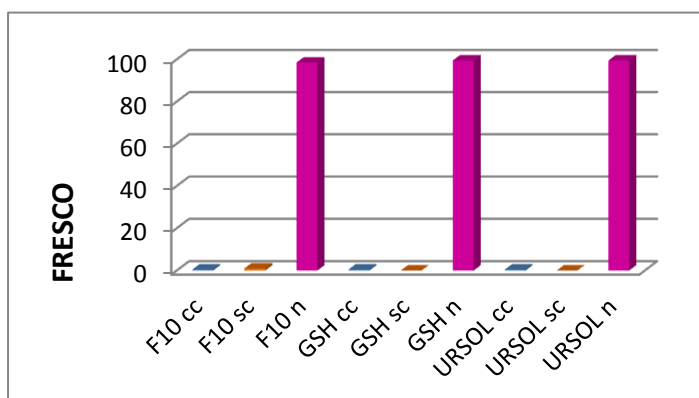


La movilidad espermática en general, es media, ya que llega al 50%, por tanto, la motilidad se conserva cuando los espermatozoides se mantienen frescos en la estufa a una temperatura constante, el paso de los días hará que la motilidad se vaya perdiendo.

Comparación de la movilidad espermática de las muestras congeladas y frescas; los resultados están expresados en %; en color azul se indican los individuos móviles y en verde los inmóviles; las siglas indican la muestra de la que se trata (F10, GSH, Ácido ursólico).



La morfología espermática es correcta ya que el porcentaje de espermatozoides anormales en todas las muestras es inferior al 2%, se observa que la congelación no afecta a la morfología espermática, y esto es positivo.



La morfología espermática es correcta ya que el porcentaje de espermatozoides anormales es muy escaso o nulo, no supera el 1% en ninguna de las muestras, por tanto, las muestras mantenidas en fresco en estufa a una temperatura constante mantienen su morfología intacta.

Comparación de la morfología de las muestras congeladas y frescas; los resultados están expresados en %; el color azul representa a los individuos de cola corta, naranja sin cola y rosa a los normales, las siglas indican la muestra de la que se trata (F10, GSH, Ácido ursólico).

ESTUDIO DE LA FRAGMENTACION DE ADN:

Los resultados se interpretan calculando el % de espermatozoides con ADN fragmentado a través de la siguiente fórmula:

$$SDF(\%) = \frac{(\text{ADN Fragmentado} + \text{ADN Degradado})}{\text{Total de células contadas}} \times 100$$

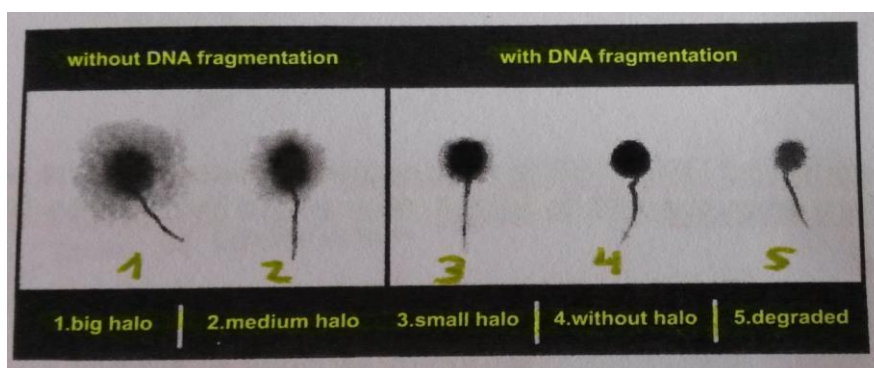
Para hacer el cálculo y poder saber qué % de ADN está fragmentado, previamente hay que observar las muestras al microscopio y contar los diferentes tipos de espermatozoides, que son:

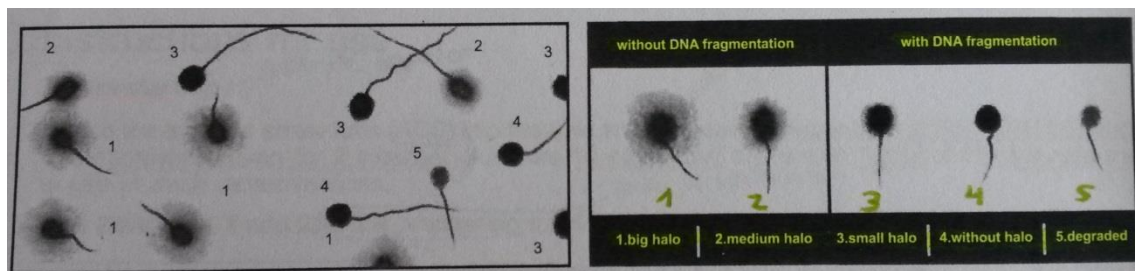
- Halo grande.
- Halo mediano.
- Halo pequeño.
- Sin halo.
- Degradado.

A la hora de aplicar la fórmula anterior, los espermatozoides de halo grande y halo mediano se considerarán como ADN no fragmentado y los espermatozoides de halo pequeño, sin halo y degradados se considerarán como ADN fragmentado.

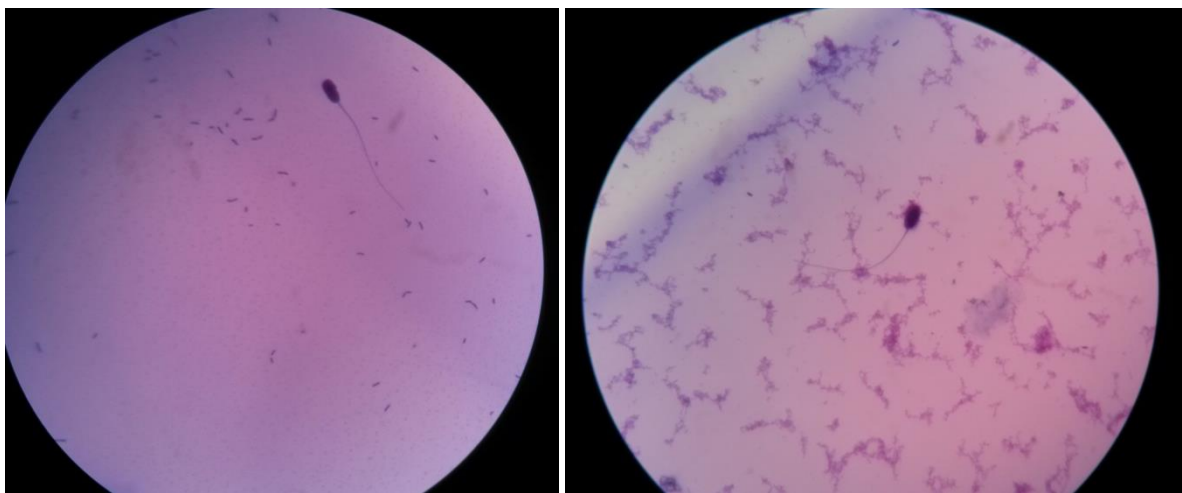
A continuación se muestra una imagen orientativa sobre los diferentes tipos de espermatozoides anteriormente nombrados.

Se contarán 200 espermatozoides.

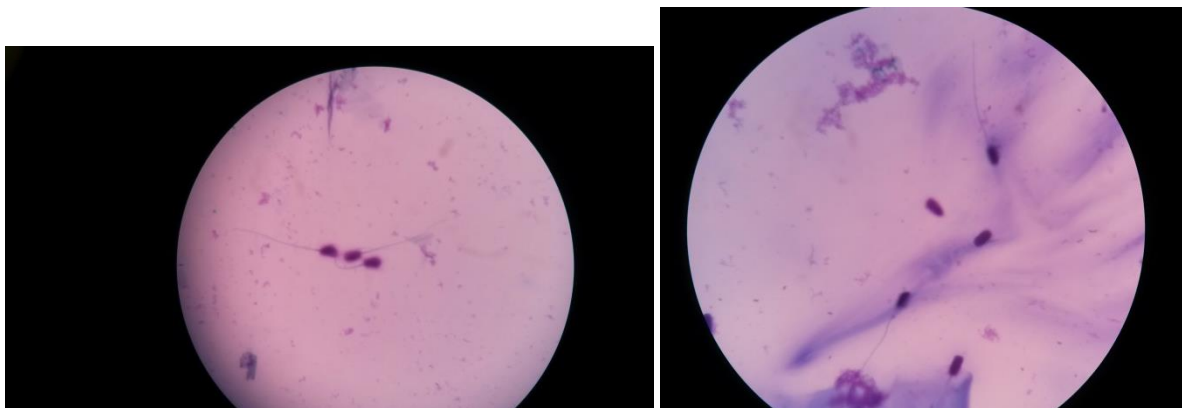




Dibujos extraídos del protocolo de Halosperm, que indican a que corresponde cada una de las muestras observadas.



Muestra de esperma con el kit de Halosperm sin halo. Muestra de esperma con el kit de Halosperm, se observa un pequeño halo.



Muestra de esperma con el kit de Halosperm con un pequeño halo y sin halo.

Los resultados son los siguientes:

MUESTRAS CONGELADAS						
	Halo grande	Halo mediano	Halo pequeño	Sin halo	Degradado	SDF (%)
F10	0	16	58	120	6	95
GSH	0	32	70	98	0	84
Ursólico	0	8	91	100	1	96
MUESTRAS FRESCAS						
	Halo grande	Halo mediano	Halo pequeño	Sin halo	Degradado	SDF (%)
F10	0	2	30	168	0	99
GSH	0	8	82	110	0	96
Ursólico	0	0	120	80	0	100

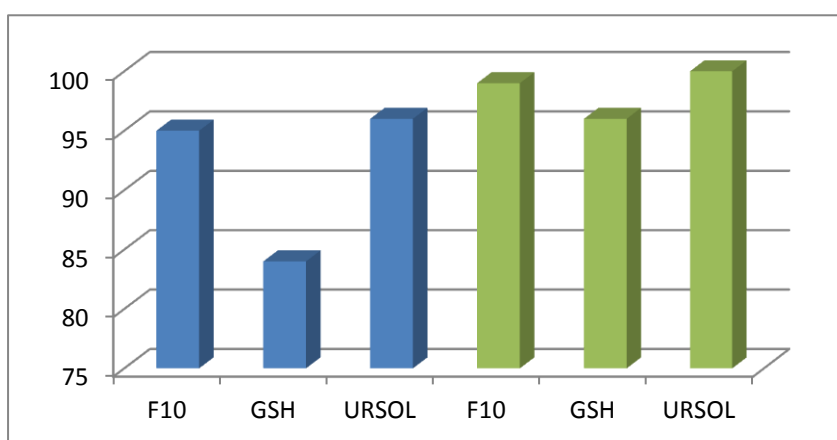


Gráfico comparativo del SDF % de las muestras congeladas y frescas. Los datos se expresan en %. El color azul representa a las muestras congeladas y el verde a las frescas; las siglas indican la muestra de la que se trata (F10, GSH, Ácido ursólico).

Muestras en fresco:

Se observa que el % de fragmentación del ADN espermático es alto, ya que en todos los casos supera el 95%.

Muestras congeladas:

Se observa que el % de fragmentación del ADN espermático es alto, ya que en todos los casos supera el 85%.

El % de fragmentación espermática del ADN en ambos casos es muy alto.

Datos de los controles:

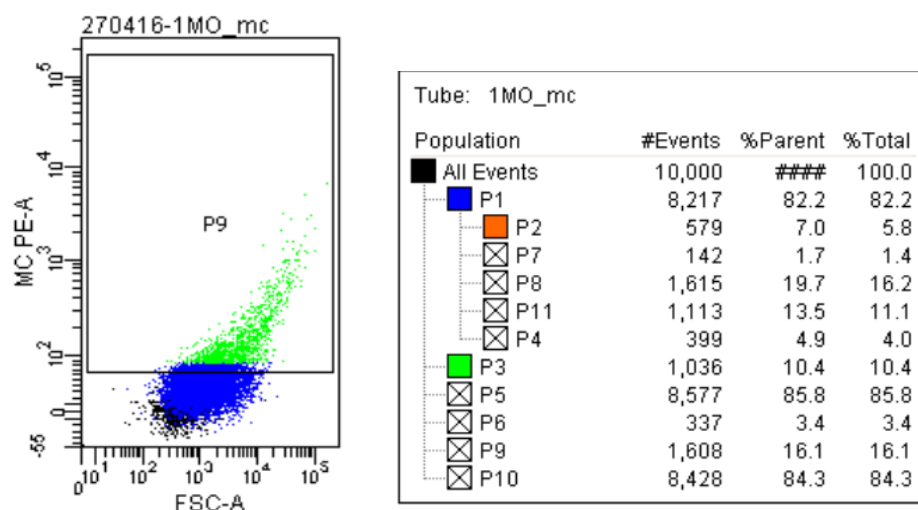
	Halo grande	Halo mediano	Halo pequeño	Sin halo	Degradado	SDF (%)
Control negativo	31	153	10	5	1	8,5
Control	0	0	164	34	2	100

CITOMETRIA DE FLUJO:

A continuación se reflejan los datos obtenidos en citometría de flujo:

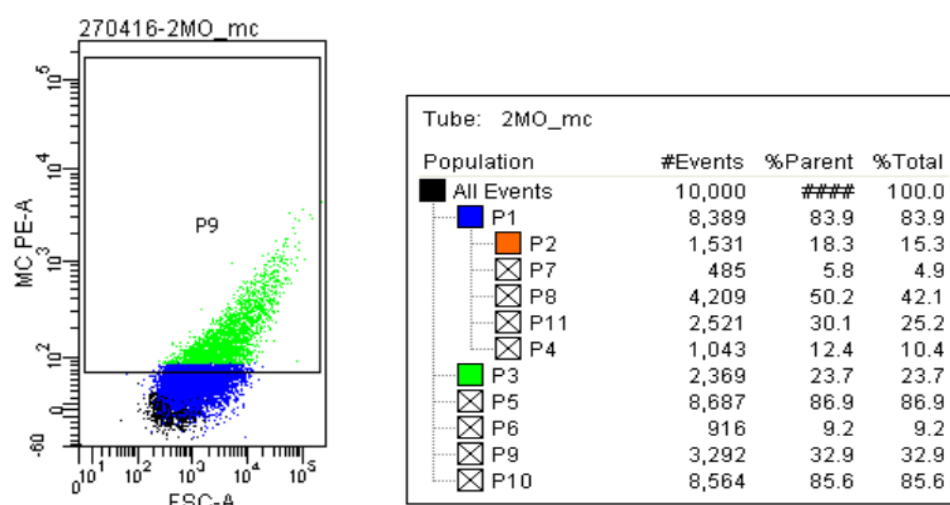
Estudio de las alteraciones de membrana:

Resultados de la muestra congelada que solo contiene medio F10 con Merocianina 540:



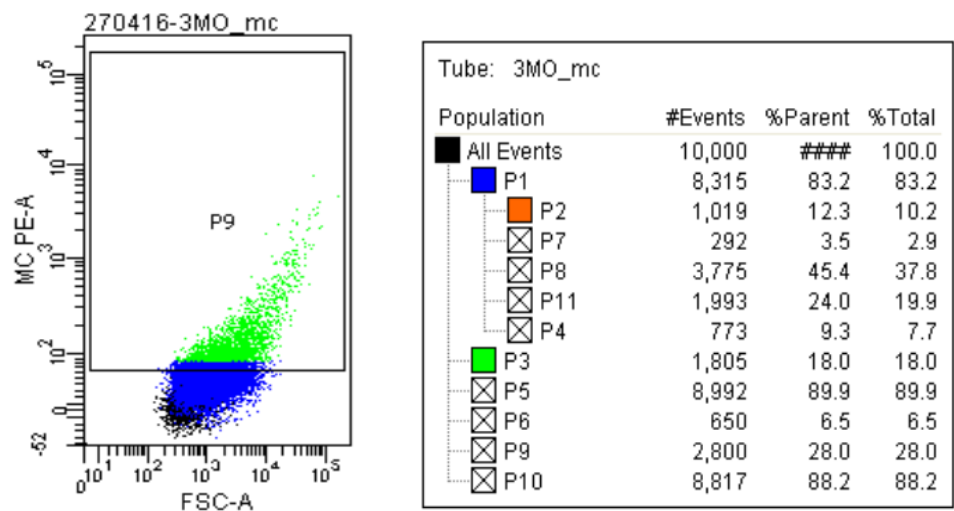
El gráfico de dispersión muestra la parte de la población celular que ha dado fluorescencia y por tanto esta dañada (en color verde); la tabla de la derecha muestra cuantitativamente qué porcentaje de la población ha dado fluorescencia (en verde), en este caso, ha dado fluorescencia un 10.4% de la población.

Resultados de la muestra congelada que contiene GSH con Merocianina 540:



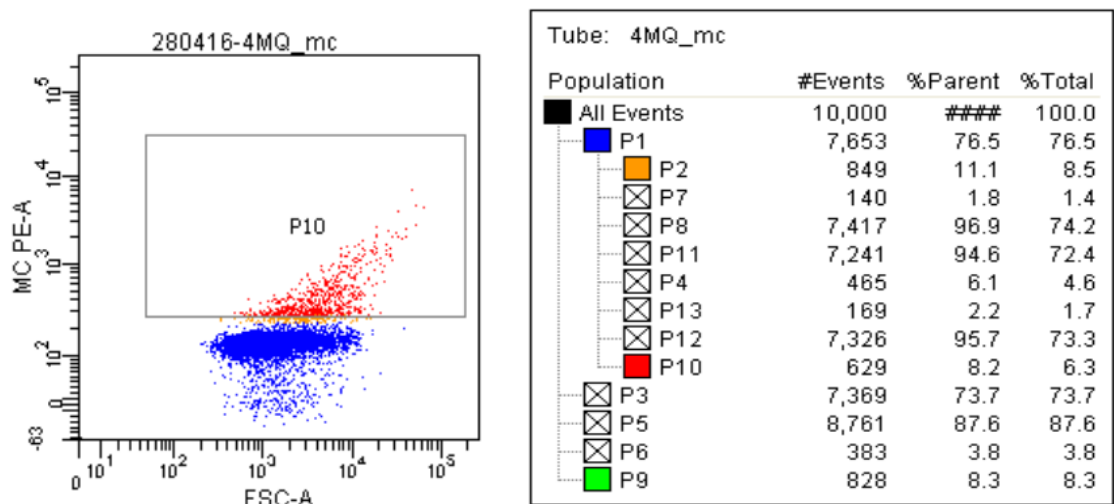
En el gráfico de la izquierda, en verde, se observa la población que ha dado fluorescencia, y que, por tanto esta dañada, a la derecha, se observa en verde en la columna central, que este valor cuantitativamente es 23,7%.

Resultados de la muestra congelada que contiene Ácido ursólico con Merocianina 540:



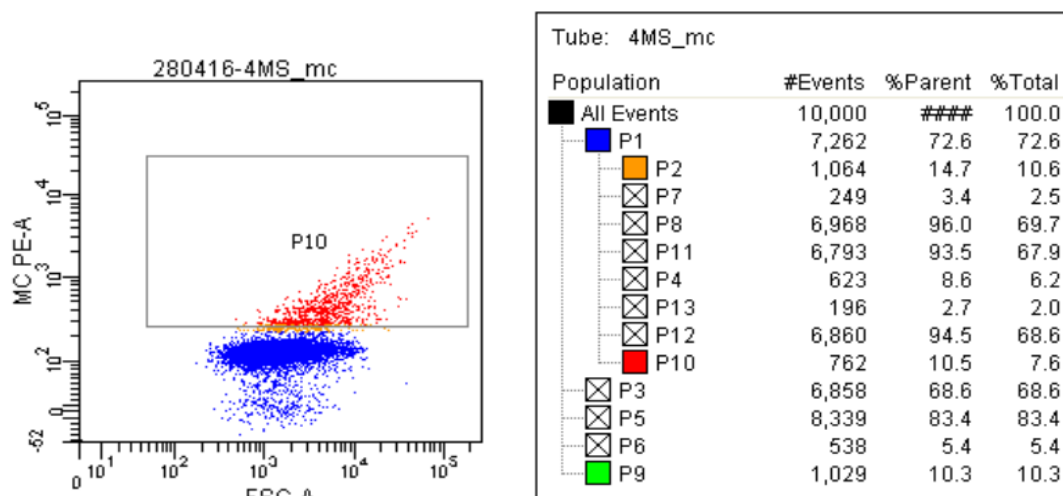
En este caso, se observa que el porcentaje de la población que presenta daño y por tanto fluorescencia es del 18%.

Resultados de la muestra fresca que contiene medio F10 con Merocianina 540:



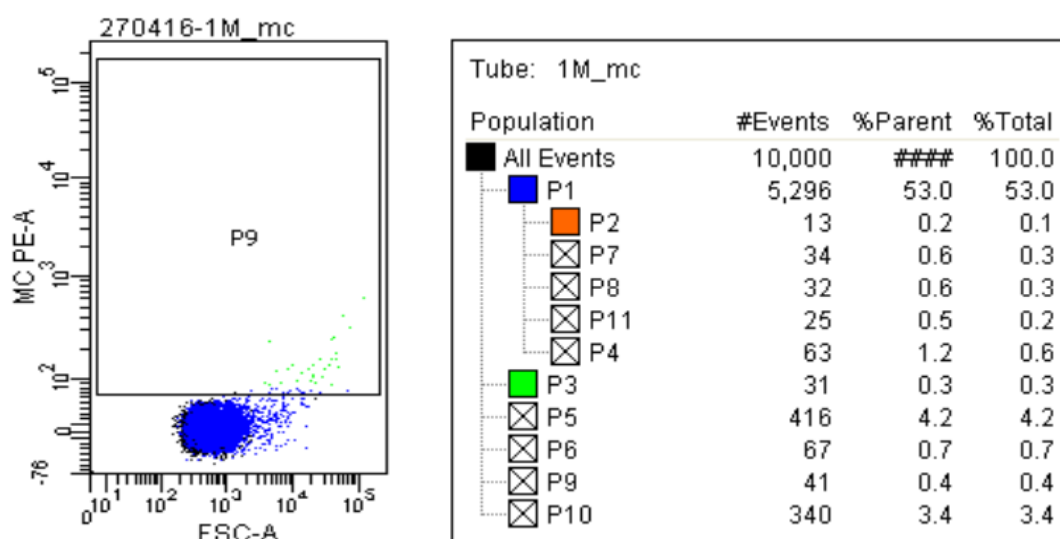
En el gráfico se observa el daño en color rojo, en el cuadro de la derecha se observa que el % de ese daño ha sido del 8.2%.

Resultados de la muestra fresca que contiene GSH con Merocianina 540:



En el gráfico se observa el daño de la muestra en color rojo, a la derecha se puede que el % de ese daño ha sido del 10.5%.

Resultados de la muestra que contiene Ácido ursólico con Merocianina 540:



En el gráfico se observa que el daño es mínimo (en verde), el valor es de 0,3, a la derecha.

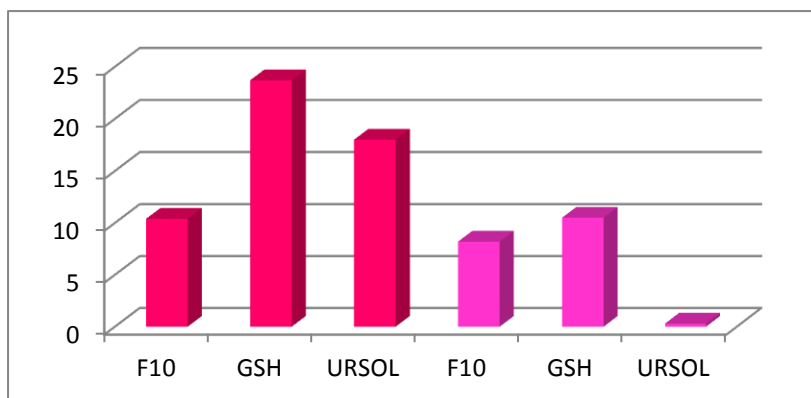


Gráfico comparativo de las muestras de Merocianina 540, los resultados están indicados en %. El color oscuro representa las muestras congeladas y el claro las muestras frescas; las siglas indican la muestra de la que se trata (F10, GSH, Ácido ursólico).

Muestras congeladas:

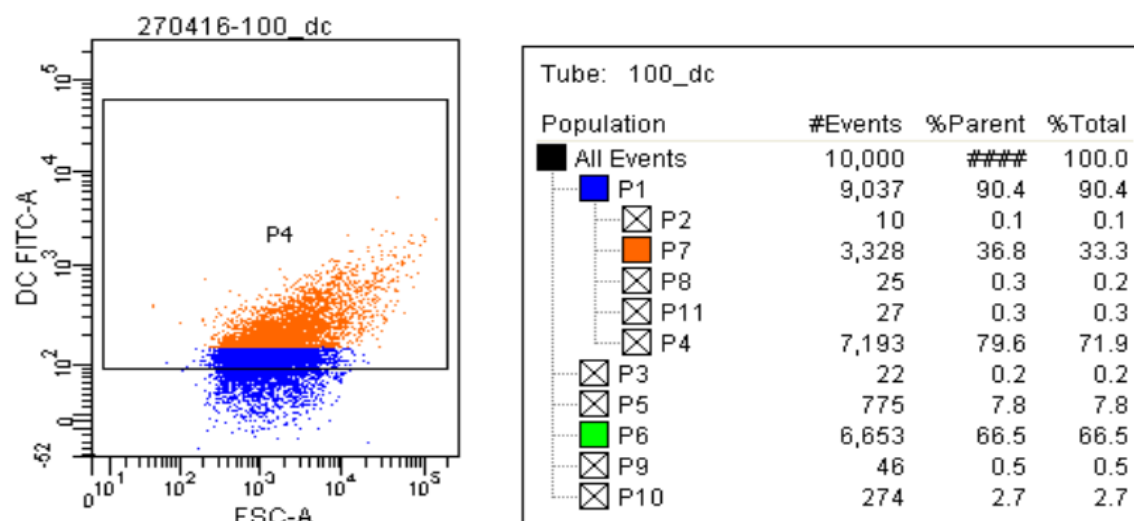
El porcentaje medio de la población es del 18%, por lo tanto, los daños de membrana no han sido muy altos al congelar y descongelar las muestras y por lo tanto la integridad de la membrana se conserva bastante bien después de el proceso de congelación – descongelación.

Muestras en fresco:

El porcentaje medio de la población es del 6 %, por lo tanto, los daños de membrana son bajos en las muestras en fresco conservadas en estufa a temperatura constante.

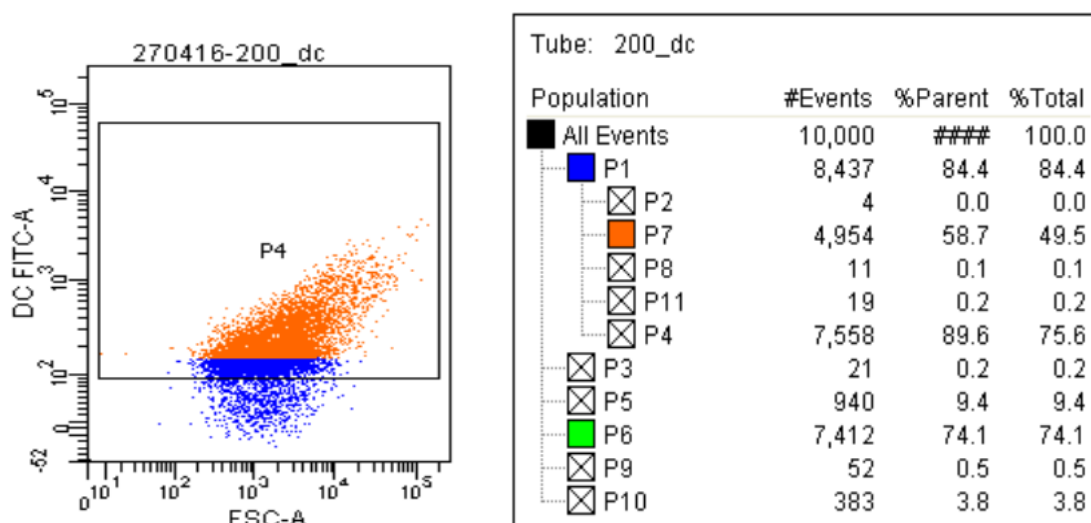
Estudio ROS:

Resultados de la muestra congelada que contiene medio F10 con Diclorofluoresceína:



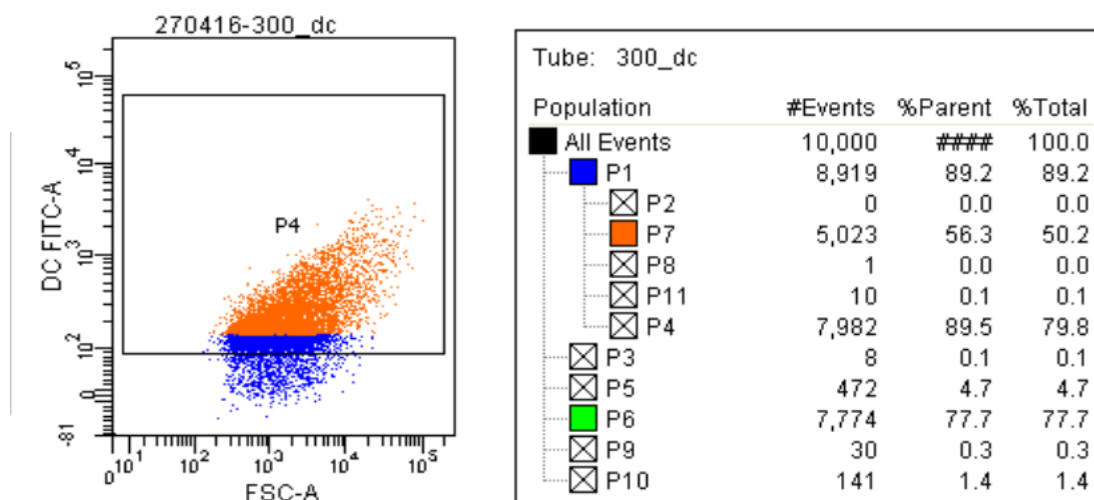
En el gráfico se observa en color naranja el daño, ese valor es de 36,8%

Resultados muestra congelada que contiene GSH con Diclorofluoresceína:



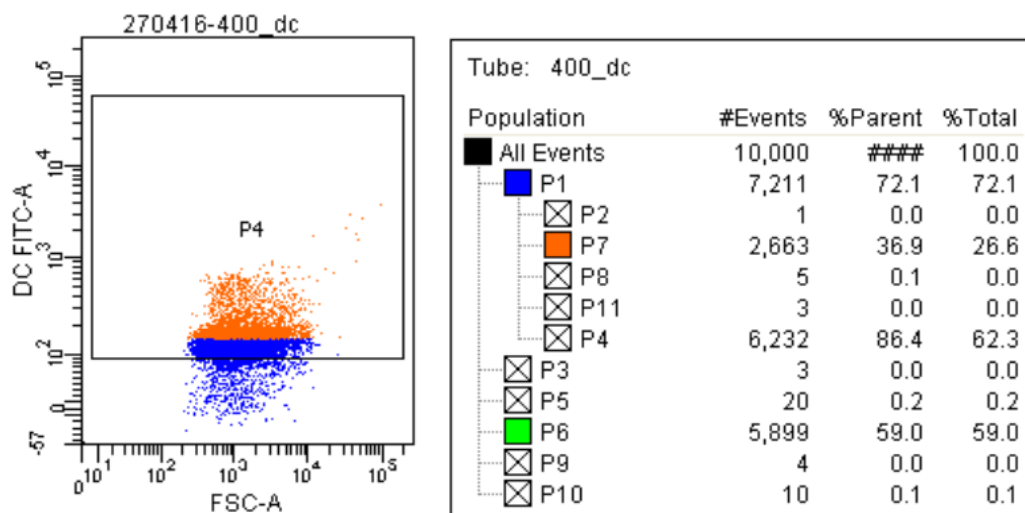
El porcentaje de daño es del 58.7%, esta representado en color naranja.

Resultados muestra congelada que contiene Ácido ursólico con Diclorofluoresceína:



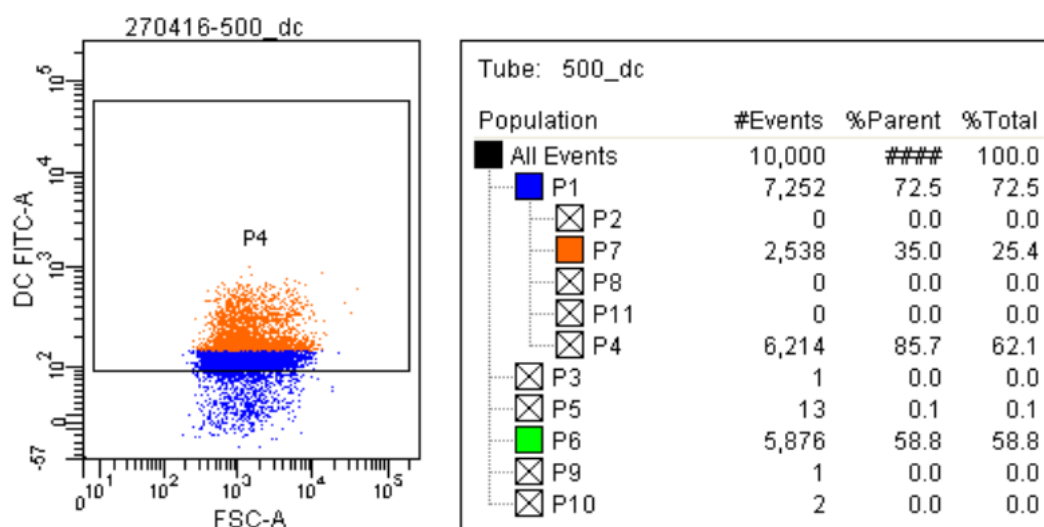
El grado de daño es del 56.3%, esta representado en color naranja en la gráfica .

Resultados muestra fresca que contiene medio F10 con Diclorofluoresceína:



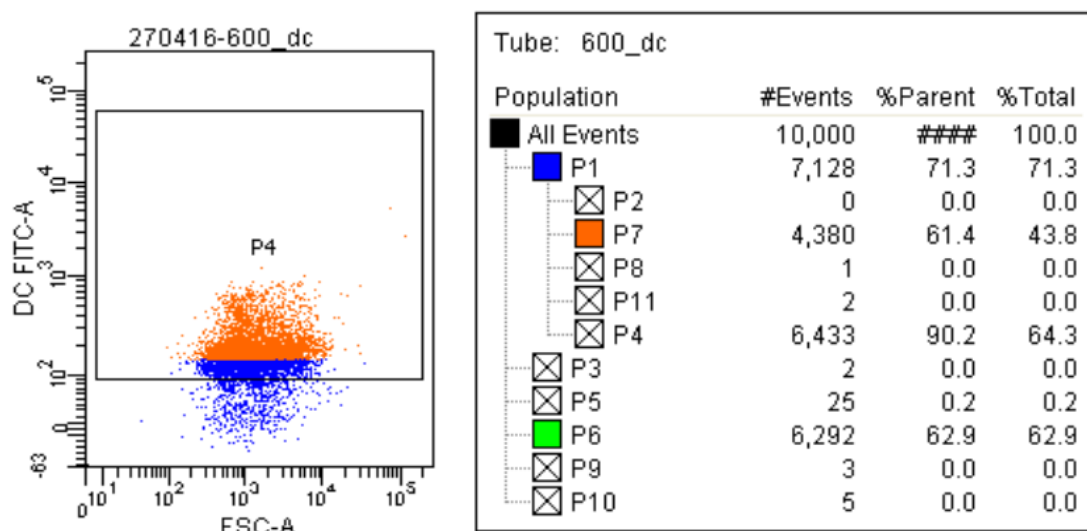
El grado de daño es del 36.9% y esta representado en color naranja.

Resultados muestra fresca que contiene GSH con Diclorofluoresceína:



El porcentaje de daño es de 35%, esta representado en color naranja.

Resultados muestra fresca que contiene Ácido ursólico con Diclorofluoresceína:



El daño esta representado en color naranja y este es del 61.4%.

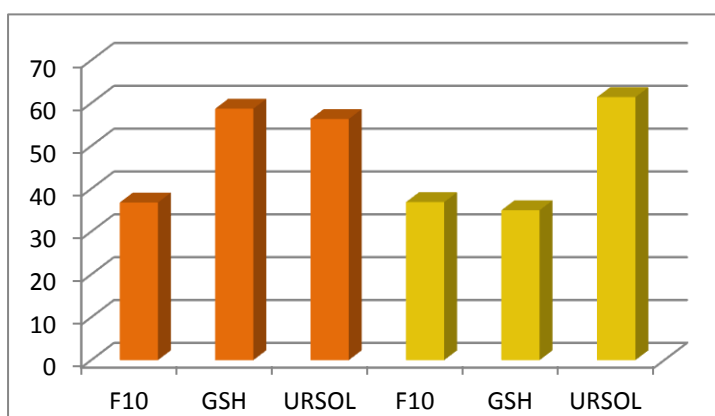


Gráfico comparativo de las muestras con Diclorofluoresceína, los resultados están indicados en %. El color oscuro representa las muestras congeladas y el claro las muestras frescas; las siglas indican la muestra de la que se trata (F10, GSH, Ácido ursólico).

Muestras congeladas:

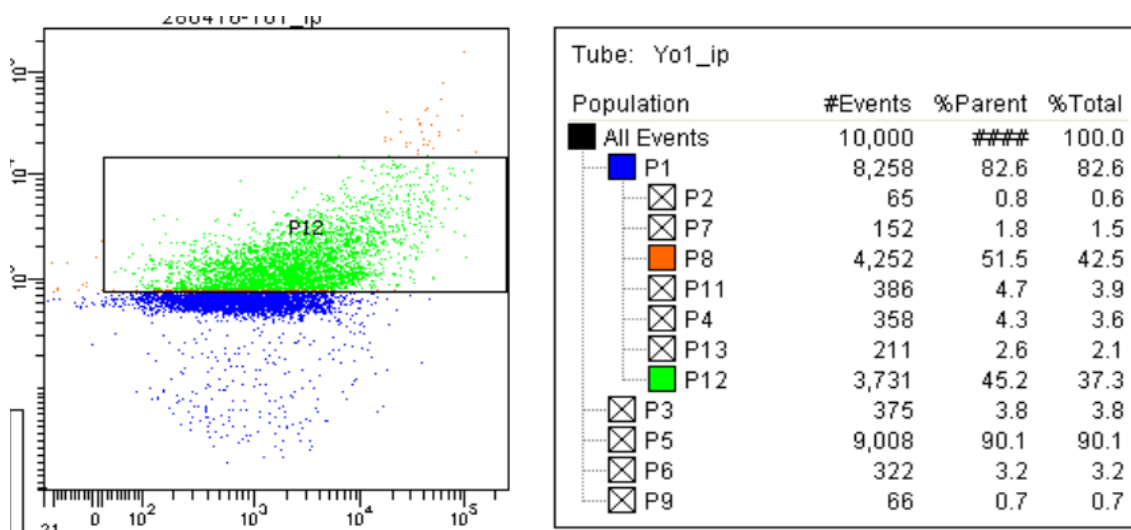
El porcentaje medio de la población supera el 50%, esto quiere decir que la cantidad de ROS es alta, y por tanto, que la congelación contribuye a que aparezcan ROS.

Muestras en fresco:

El porcentaje medio de la población obtenido es del 44%, es un % bastante alto.

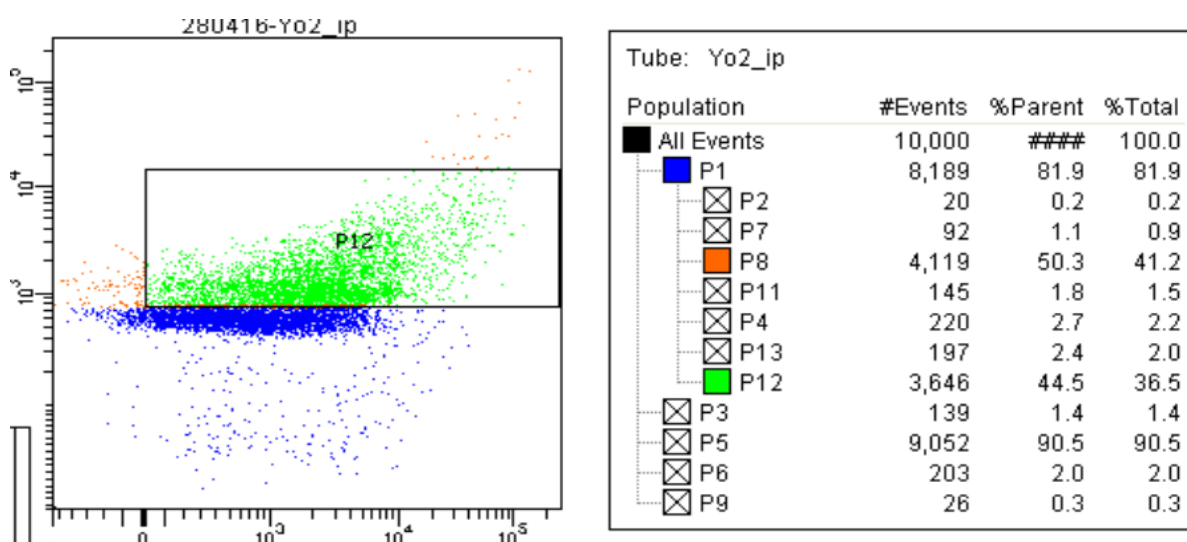
Estudio de apoptosis y muerte celular:

Resultados de la muestra congelada que contiene medio F10 con Yoduro de propidio:



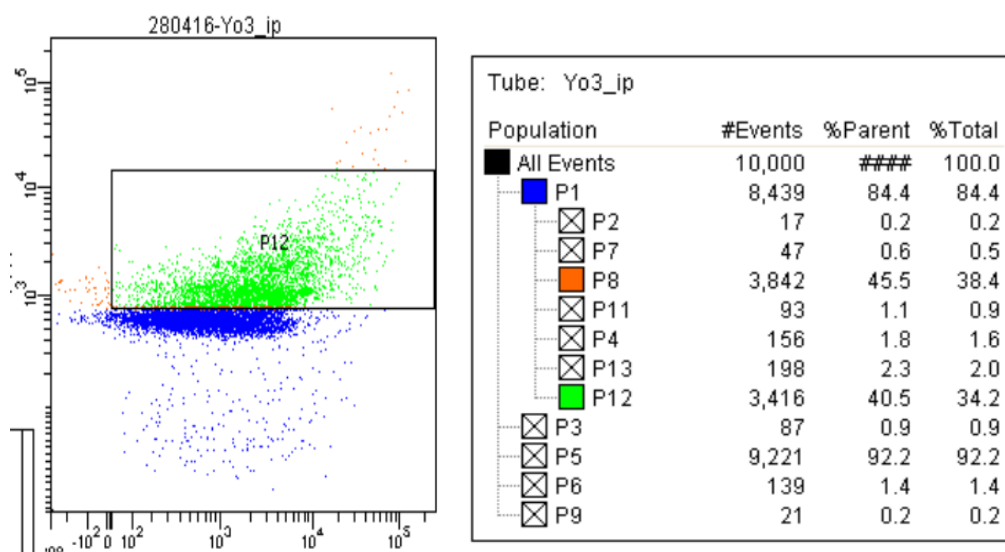
En este caso el daño esta representado en color verde y es del 45.2%.

Resultados de la muestra congelada que contiene GSH con Yoduro de propidio:



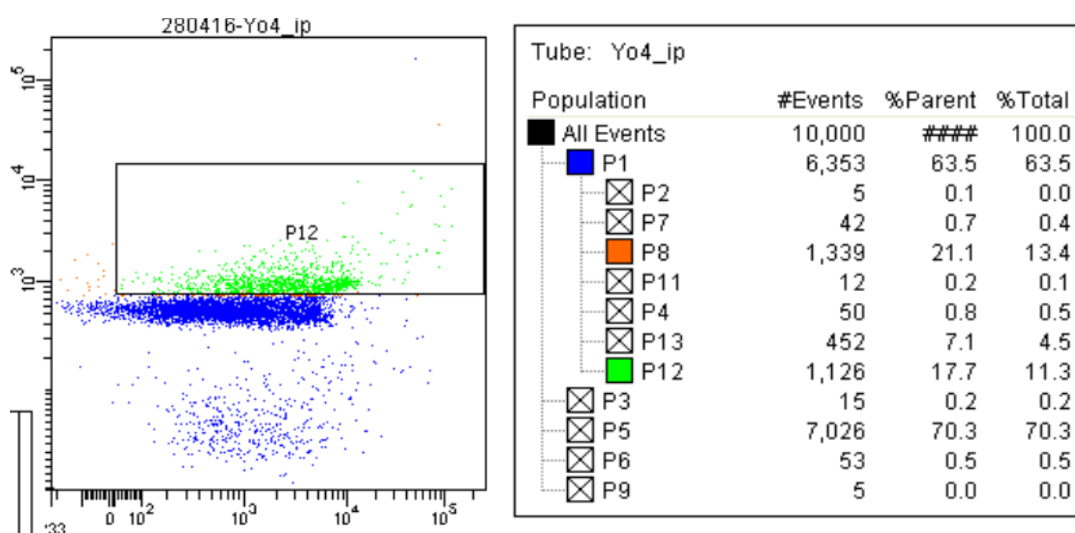
El daño es del 44.5%, esta representado en verde.

Resultados de la muestra congelada que contiene Ácido ursólico con Yoduro de propidio:



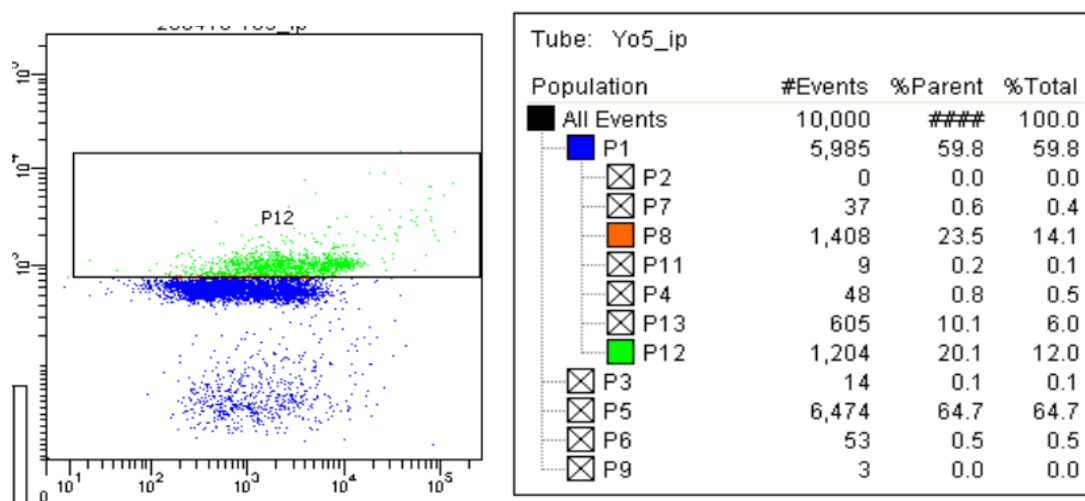
El daño está representado en color verde y es del 40.5%.

Resultados de la muestra fresca que contiene medio F10 con Yoduro de propidio:



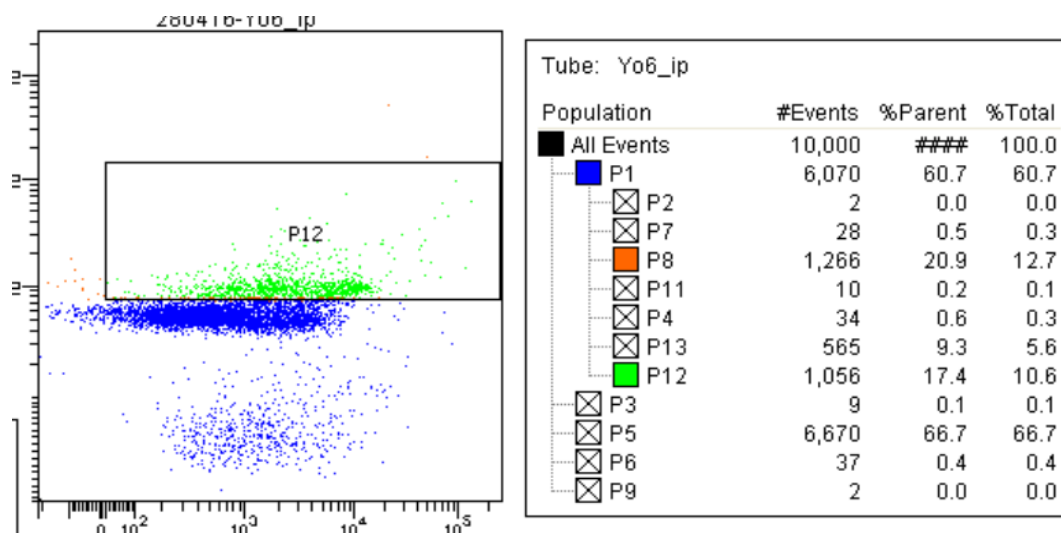
El daño es del 17.7% y se representa en color verde en la gráfica.

Resultados de la muestra en fresco que contiene GSH con Yoduro de propidio:



El daño de esta muestra es del 20.1% y se refleja en color verde en la gráfica.

Resultados de la muestra congelada que contiene Ácido ursólico con Yoduro de propidio:



El grado de daño en este caso es del 17.4% y se muestra en color verde en la gráfica.

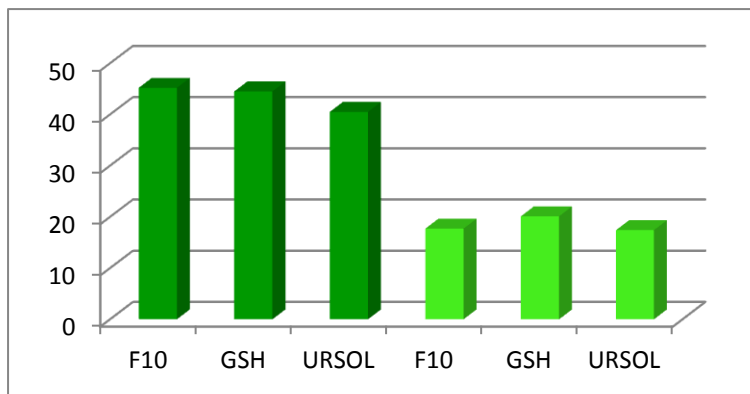


Gráfico comparativo de las muestras con Yoduro de propidio, los resultados están expresados en %. El color oscuro representa a las muestras congeladas y el claro a las muestras frescas; las siglas indican la muestra de la que se trata (F10, GSH, Ácido ursólico).

Muestra congelada:

El porcentaje medio de la población es del 44%, es un porcentaje alto, esto quiere decir que la congelación afecta al envejecimiento celular.

Muestra en fresco:

El porcentaje medio de la población es del 55%, esto quiere decir que el envejecimiento celular es mas rápido cuando la muestra se mantiene en fresco.

DISCUSION

Pinart E., et al, investigaron si se modificaba la actividad de la acrosina cuando se congelaban y descongelaban los espermatozoides de verraco; es decir, si la congelación modificaba la actividad espermática; para ello congelaron y descongelaron mediante diferentes pasos distintas muestras de esperma de verraco. Después de hacer todo el proceso y ver los resultados, observaron que no había diferencias con respecto a la motilidad espermática o a la integridad de la membrana, pero vieron que la acrosina si que era indicador de congelabilidad espermática; también se modificaron otros parámetros como la cinemática del esperma, los lípidos de membrana, la integridad acrosomal, etc (Pinart E., Yeste M., Bonet S., 2015); como se puede observar en nuestro estudio si se han modificado algunos de esos parámetros al congelar las muestras como la movilidad espermática o la integridad de la membrana, esto se puede deber a que las técnicas de congelación- descongelación de nuestro estudio con respecto a este son diferentes y el experimento no es igual aunque el semen si sea del mismo animal.

García O., et al, investigaron también sobre la capacitación espermática, de cómo se afectaba al utilizar diferentes medios sintéticos con respecto al utilizado siempre y concluyeron que de todos los medios utilizados, solo uno inducía cambios compatibles con la capacitación espermática en relación a la movilidad y a la membrana, y que el medio mas efectivo era el utilizado siempre (García O., Maroto A., Jiménez P., et al., 2015); en cuanto a nuestro estudio, podemos decir que la

similitud con este se encuentra en los parámetros medidos, y que también se han encontrado alteraciones al cambiar de ambiente, habría que buscar un tratamiento y un ambiente que fuera compatible con todos los parámetros analizados, es decir, que la modificación de los parámetros fuera mínima.

Matas C., investigó con espermatozoides de verraco y utilizó para ello Yoduro de propidio y otros fluorocromos evaluó los cambios que experimentaban los espermatozoides tratados con diferentes técnicas y medios, para ello utilizó espermatozoides vivos y muertos, teñidos con Yoduro de propidio; observó que había gran mortalidad espermática, pero que uno de los tratamientos utilizados (progesterona), protegía la vitalidad de los espermatozoides; también comparó la eficacia de dos técnicas: microscopía y citometría, viendo que la citometría era más eficaz (Matas C., 1997), al igual que en nuestro estudio, observó que el Yoduro de propidio es muy eficaz para detectar células degeneradas, y que se diferencian con claridad las poblaciones marcadas; esto también sucede en nuestro estudio.

Sun J. G., et al, investigaron la incidencia de la fragmentación de ADN en espermatozoides y correlacionaron los daños observados con los parámetros de análisis de semen y fertilización in vitro; concluyeron con una correlación negativa entre el porcentaje de ADN fragmentado, la motilidad, la morfología y la concentración del eyaculado espermático; los resultados demostraron que hay una alta probabilidad de que espermatozoides con ADN fragmentado puedan ser seleccionados por casualidad y usados para fertilización in vitro (Sun J. G., Jurisicova A., Casper R. F., 1997); con respecto a nuestro estudio podemos decir que también se produce gran porcentaje de ADN fragmentado, y que habrá que intentar suprimir estos problemas ya que podrían afectar a la fertilización, como bien concluyeron Sun J. G. et al.

Sanocka D., et al., estudiaron las especies reactivas de oxígeno (ROS) y cómo afectaban estas a las células espermáticas, comprobaron que los radicales libres pueden ser altamente reactivos y oxidar el ADN y otros elementos causando mutaciones, y que las ROS pueden ser producidas por diversas causas (Sanocka D., Kurpisz M., 2004); con respecto a nuestro estudio, se observa que el número de ROS producidas en el espermatozoides en fresco es bastante elevado, después de la congelación aumenta, esto indica que la congelación sí que influye a la hora de producir ROS; no obstante, hay que tener en cuenta el elevado número de especies reactivas de oxígeno antes del proceso de congelación y como indican Sanocka et al

en su artículo habría que investigar acerca de los componentes del esperma y cómo se transforman estos a causa de diferentes factores como por ejemplo el estrés, y habría que aclarar si unas pocas de ROS son perjudiciales o no; habría que investigar la estructura y los cambios funcionales en la membrana del espermatozoide durante el período de peroxidación para así poder entender el papel del metabolismo de los lípidos espermáticos y poder ayudar a desarrollar nuevas estrategias para la infertilidad.

Aitken R. J., et al investigaron acerca de los defectos celulares en la función espermática y la asociación que esto tenía con las especies reactivas de oxígeno en los espermatozoides; lo que hicieron fue inducir la producción de ROS y vieron que esta actividad era dependiente de calcio, también eliminaron las ROS y tras varios experimentos, vieron que el anión superóxido es un producto principal que esta activado en el espermatozoide (Aitken R. J., Clarkson J.S., 1987); con respecto a nuestro estudio, se observa que en las muestras en fresco, hay gran cantidad de especies reactivas de oxígeno, a parte de deberse a diversos parámetros habría que comprobar si nuestras muestras también tienen el anión superóxido activo, porque si es así siempre se produciría una pequeña cantidad de ROS por defecto.

Gadea J., et al investigaron acerca del contenido de GSH en los espermatozoides porcinos eyaculados antes y después de la criopreservación; probaron la capacidad de los espermatozoides congelados – descongelados in vitro y vieron que después de la criopreservación disminuyó el contenido de GSH, pero entre los diferentes verracos no hubo diferencias (Gadea J., Sellés E., Marco M. A., et al., 2004); con respecto a nuestro estudio, se le añadió el GSH al esperma de verraco y en general se observó que para el esperma congelado no es un buen criopreservador ya que casi todos los parámetros analizados se han visto alterados y para el esperma en fresco si es un buen criopreservador ya que muy pocos parámetros se ven alterados, por tanto, habría que buscar un criopreservador alternativo o ver por qué en nuestro estudio no se produce correctamente la función del GSH en el esperma congelado.

Gadea J., et al investigaron acerca de los efectos del glutatión y las fases de congelación del proceso de criopreservación para compensar la disminución en el contenido de GSH observada durante la congelación del esperma y concluyeron que al añadir GSH a los medios de congelación se mejora el porcentaje de motilidad y los parámetros de movimiento de los espermatozoides descongelados, entre otros factores (Gadea J., García F., Matás C., et al., 2005); con respecto a nuestro estudio

y al contrario de lo que concluyen Gadea J., et al se observa que la motilidad no mejora ni en las muestras congeladas ni en las muestras en fresco al añadir GSH, lo mismo pasa con la mayoría de los parametros analizados, sobre todo en el espermatozoides congelado, por tanto, habría que investigar cómo mejorar el experimento para que al igual que a ellos el GSH no afectara los diferentes parámetros de nuestras muestras experimentales.

CONCLUSION

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

ESTUDIO MICROSCOPICO:

Se observa que la congelación afecta a la motilidad, ya que esta es nula; también afecta a la vitalidad, ya que esta es muy baja; la morfología no se ve alterada.

En las muestras en fresco se observa que la movilidad espermática es media; la morfología espermática es correcta y la vitalidad es alta; por tanto, las muestras en fresco mantenidas en estufa a temperatura constante se mantienen viables.

ESTUDIO DE LA FRAGMENTACION DE ADN:

Tanto en las muestras congeladas como en las muestras en fresco se observa que el porcentaje de fragmentación del ADN espermático es alto, habría que averiguar el por qué de estos resultados e intentar solucionarlo, ya que si se fragmenta el ADN espermático esos espermatozoides serán defectuosos y conllevarán múltiples problemas si se implantan.

CITOMETRIA DE FLUJO:

En las muestras congeladas que contienen Merocianina se observa que los daños no han sido muy altos y que la integridad de la membrana se conserva bastante bien; en las muestras que contienen Diclorofluoresceína se observa que el porcentaje de ROS es alto; en las muestras que contienen Yoduro se observa que el porcentaje es alto y por tanto, la congelación contribuye al envejecimiento celular.

En las muestras en fresco se observa que las que contienen Merocianina presentan muy pocos daños de membrana; en las que contienen Diclorofluoresceína se observa que el número de ROS es elevado y en las que contienen Yoduro se observa que el envejecimiento celular es bastante alto y por tanto, también se ve afectado.

La conclusión final es que la congelación afecta a la mayoría de los parámetros analizados, la solución sería buscar otros criopreservadores y antioxidantes que

fueran mas efectivos y con los que no se vieran dañados los espermatozoides; el criopreservador ideal sería aquel que resistiera altas y bajas temperaturas y con el que no se vieran afectados la mayoría de los parámetros analizados ya que cuantos menos parámetros se vean afectados más efectivas serán las técnicas de reproducción asistida; el objetivo del estudio es observar como varían esos parámetros al comparar muestras congeladas y frescas y así poder evitar al máximo la mayor cantidad de problemas en reproducción asistida posibles.

REFERENCIAS

A

Agarwal A., Said T.M., Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility, Hum Reprod Update, 2003; 9:331–345.

Aitken R.J., Free radicals, lipid peroxidation and sperm function, Reprod Fertil, 1995; 7:659–668.

Aitken R.J., Clarkson J.S., Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa, J Reprod Fertil, 1987; 81:459–469.

Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., et al., Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa, Biology of reproduction, 1998; 59:1037-1046.

B

Balao C. M., Ortega C., Morrell J. M., et al., Flow cytometric chromosomal sex sorting of stallion spermatozoa induces oxidative stress on mitochondria and genomic DNA, Reproduction in domestics animals, 2016; 51: 18- 25.

D

Doyle et al, Propidium iodide protocol, 1995.

F

Fernandez J.L., Muriel L., Rivero M.T, et al., The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation, Journal of andrology, 2003; 24: 59-66.

G

Gadea J., García F., Matás C., et al., Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function, Journal of andrology, 2005; 26: 396-404.

Gadea J., Sellés E., Marco M. A., et al., Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders, *Theriogenology*, 2004; 62: 690-701.

García O., Maroto A., Jiménez P., et al., Effect of different media additives on capacitation of frozen- thawed ramspermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum, *Theriogenology*, an international journal of animal reproduction, 2015; 84: 948- 955.

Garner D. L., Pinkel D., Johnson L. A., Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses, *Biol. Reprod*, 1986; 34: 127-135.

H

Halotech. Halosperm G2, protocolo.

I

Ioannou D., Miller D., Griffin D.K., et al., Impact of sperm DNA chromatin in the clinic, *J assist reprod genet*, Springerlink.com, 2015.

J

Jie L., Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *Journal of ethnopharmacology*, 1995; 49: 57-68.

L

Langlais J., Roberts K. D., A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa, *Gamete res.*, 1985; 12: 183-224.

Lodish H., Berk, Matsudaira, *Biología celular y molecular*, 5ª edición, 2005.

Lebel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S., Evaluation of the pprobe 2,7-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol*, 1992; 5: 227- 231.

M

Martínez J.C., García A., Gumbao D., et al., Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets, *Cryobiology*, 2011.

Matas C., Analisis mediante citometria de flujo de la respuesta de los espermatozoides de verraco a diferentes medios de incubacion, *Facultad de veterinaria. Patologia animal*, 1997.

Miyazaki R., Fukuda M., Takeuchi H., et al., Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm, *Arch. Androl.*, 1990; 25: 243- 251.

Moncrieffe H., University college London, Reino Unido, British society for immunology.

P

Peinado M.A., Pedrosa J.A., Aranda F., et al., Biología celular, 2ª edición, 1996; 88-90.

Pinart E., Yeste M., Bonet S., Acrosin activity is a good predictor of boar sperm freezability, Theriogenology, an international journal of animal reproduction, 2015; 83: 1525- 1533.

Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., et al., The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, Biochem pharmacol, 2003; 66:1499-1503.

R

Ramzam M.H., Ramzam M.,Khan M.M., et al., Human semen quality and sperm DNA damage assessed by comet assay in clinical groups, Turk J med sci, 2015; 45:729-737.

S

Sanocka D., Kurpisz M., Reactive oxygen species and sperm cells, Reproductive biology and endocrinology, 2004; 2: 12.

Storey B. T., Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa, Mol. Hum. Reprod., 1997, 3: 203- 213.

Sharma R.K., Said T., Agarwal A., Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome, Asian J androl, 2004; 6:139-148.

Sieber F, Merocyanine 540, Photochemistry and photobiology, 1987; 46:1035-1042.

Sun J. G., Jurisicova A., Casper R.F., Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro, Bio reprod, 1997; 56: 602- 607.

Y

Yanagimachi R., Mammalian fertilization. En: The physiology of reproduction, 1988.