



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL EFECTO DE LOS METALES PESADOS SOBRE LA FUNCIÓN DEL ESPERMA MEDIANTE ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD

Alumno: Irene Leonés Baños

Junio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIA EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGÍA

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL EFECTO DE LOS METALES PESADOS SOBRE LA FUNCIÓN DEL ESPERMA MEDIANTE ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD

Alumna: Irene Leonés Baños

Jaén, junio 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Antecedentes	6
2.2 Marco teórico	8
2.2.1 <i>Ácido Docosahexaenoico (DHA)</i>	8
2.2.2 <i>Ácido ursólico</i>	10
2.2.3 <i>Pesticidas: cipermetrina</i>	10
2.3 Evaluación seminal	11
2.3.1 <i>Parámetros rutinarios de análisis</i>	11
2.3.2 <i>Principios de las técnicas</i>	13
2.3.2.1 <i>Fragmentación de ADN</i>	13
2.3.2.2 <i>Especies ROS</i>	14
2.4 Objetivos	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Obtención de material y muestras	16
3.2 Diseño experimental	17
3.3 Análisis microscópico	17
3.4 Estudio de la fragmentación de ADN	21
3.5 Especies ROS	24
3.6 Análisis estadístico	26
4. RESULTADOS	26
4.1 Análisis microscópico	26
4.2 Estudio de la fragmentación de ADN	35
4.3 Especies ROS	37
4.4 Citometría de flujo	39
5. DISCUSIÓN	42

6. CONCLUSIÓN.....	44
--------------------	----

7. BIBLIOGRAFÍA.....	44
----------------------	----

1. RESUMEN / ABSTRACT

La cipermetrina, un plaguicida piretroide sintético tipo II, se usa ampliamente en programas de control de plagas en la agricultura y la salud pública. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto potencial de la cipermetrina en los espermatozoides porcinos y los posibles efectos de mejora con la adición de sustancias antiinflamatoria y antioxidante como el ácido ursólico y de ácido graso poliinsaturado $\Omega 3$ como el ácido Docosahexaenoico (DHA), que forma parte de las membranas celulares del organismo. Las muestras de semen porcino normozoospermicos sanos se dividieron en seis grupos experimentales. Se analizaron alícuotas de semen para analizar diferentes parámetros: funcionalidad espermática (motilidad, vitalidad y morfología de los espermatozoides), fragmentación del ADN, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e integridad de la membrana. Los resultados demostraron una disminución significativa en el movimiento, la función y un mayor daño en el ADN del espermatozoide en el grupo de cipermetrina. La adición de ácido ursólico y DHA condujo a una mejora significativa en el movimiento del espermatozoide, la función del espermatozoide y el daño en el ADN, siendo mejor para el caso de ácido ursólico. Se concluye que la cipermetrina *in vitro* puede alterar de forma temporal, según las dosis administradas, la función de los espermatozoides e inducir daño en el ADN y en la membrana plasmática del acrosoma de éstos, que mejora después de usar los tratamientos.

PALABRAS CLAVE: Antioxidantes; antiinflamatorios; DHA; ácido ursólico; pesticida; cipermetrina; infertilidad masculina; piretroide; espermatozoide

Cypermethrin, a type II synthetic pyrethroid pesticide, is widely used in pest control programmes in agriculture and public health. This study aimed to assess the potential effect of cypermethrin on porcine sperm and the possible ameliorative effects with the addition of anti-inflammatory and antioxidant substances such as ursolic acid and Docosahexaenoic acid (DHA), polyunsaturated fatty acid $\Omega 3$, which is part of the cell membranes of the organism. The samples of healthy normozoospermic porcine semen were divided into six experimental groups. Aliquots of semen were analyzed to analyze different parameters: sperm functionality (motility, vitality and sperm morphology), DNA fragmentation and reactive oxygen species (ROS). The results

showed a significant decrease in sperm movement, sperm function and increased damage to sperm DNA in the cypermethrin group. The addition of ursolic acid and DHA led to a significant improvement in sperm movement, sperm function and DNA damage, being better for the case of ursolic acid. It is concluded that *in vitro* cypermethrin can temporarily alter, depending on the doses administered, the function of sperm and induce DNA damage in sperm, which improves after using the treatments.

KEY WORDS: Antioxidants; anti-inflammatories; DHA; ursolic acid; pesticide; cypermethrin; male infertility; pyrethroid; spermatozoon

2. INTRODUCCIÓN

Aunque el uso de pesticidas es beneficioso en general, su abuso es perjudicial debido a su potencial toxicidad para los humanos y los animales. El uso de insecticidas piretroides sintéticos ha aumentado últimamente debido a la necesidad de reemplazar los insecticidas organofosforados comunes por las restricciones actuales. Como consecuencia de su mayor disponibilidad, uso y aplicabilidad de amplio espectro, existe una exposición generalizada entre la población general (Nesseim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013).

2.1 Antecedentes

2018 ha sido el año con menor número de nacimientos en España desde 1941 según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE). En la actualidad, son numerosos los factores que justifican estos datos y es que no solo, como se explicarán a continuación, afectan a la infertilidad o esterilidad causas fisiológicas, patológicas, ambientales etc. También, el estilo de vida de la sociedad actual ha influido notablemente en la decisión del momento en el que tener un hijo; momento que cada vez se ve afectado por una edad más avanzada.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1992) así como la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE, 1996) en su recomendación menciona un plazo mínimo de dos años para desarrollar el embarazo; si éste no ocurre después de ese tiempo, la pareja es considerada infértil.

Desde un punto de vista práctico, la mayoría de los médicos inician los estudios de una pareja infértil después de un año de haber fracasado los intentos de embarazo. Se deben considerar los siguientes aspectos:

- Debido al impacto de la edad sobre la fertilidad, cuando una mujer tiene más de 39 años, podría ser aconsejable comenzar el estudio aunque solo hayan transcurrido seis meses de intentos fracasados. A nivel masculino también es un factor que corre en nuestra contra, la calidad del semen, en particular, de los españoles descende un 2% cada año.
- La infertilidad es una condición que afecta al 15- 20% de las parejas en edad reproductiva
- Comparado con otras especies, el ser humano es altamente ineficiente en términos de reproducción. La tasa de fertilidad por ciclo es de alrededor de 20%

Identificación de las causas de infertilidad

Alrededor del 40% de todas las parejas que consultan por infertilidad habitualmente presentan una combinación de agentes; es decir, un factor femenino combinado con un trastorno masculino. Por lo tanto, el estudio de la infertilidad siempre se debe hacer considerando la pareja en conjunto: el hombre, la mujer y las interrelaciones entre ellos.

Se debe realizar un estudio metódico de todos los factores probables de fracaso para alcanzar un embarazo. A continuación, solo nos centraremos en las causas a nivel de la infertilidad masculina ya que son las que nos incumben en nuestro estudio. El factor de migración espermática, estudio del semen (calidad y cantidad), infertilidad inmunológica, debida a factores genéticos e incluso infertilidad inexplicada (aproximadamente el 15% de las parejas, pueden no exhibir ninguna alteración objetiva que lleve a un diagnóstico definitivo), son algunas de las causas principales.

Otras causas, las cuales tendrían una relación más directa con nuestro presente estudio, son las causas sistémicas e iatrogénicas. Este tipo de causas engloban:

- Exposición a altas temperaturas, ha sido postulada como una causa de insuficiencia testicular.
- Efecto de la radiación en sus diferentes modalidades sobre la fertilidad, incluyendo la radiación ionizante y la electromagnética de alta frecuencia absorbida

por los soldadores eléctricos, por radiólogos o por individuos que trabajan con equipos de telecomunicaciones.

- Las personas que trabajan con plomo inorgánico, cadmio, mercurio, manganeso, cromo hexavalente, pesticidas, solventes orgánicos, gases anestésicos y monómeros plásticos o están expuestos a los mismos también corren el riesgo de desarrollar alteraciones más o menos graves de su función testicular.

Revisiones bibliográficas previas han puesto de manifiesto que a nivel nacional, ciudades industrializadas o que altamente explotan el sector de la agricultura y por consiguiente, mayor uso de pesticidas, poseen más problemas de infertilidad. Ciudades como Murcia son ejemplo de ello. (Murcia, L., 2019).

Finalmente indicar que herramientas como la reproducción asistida podrían paliar problemas de infertilidades, tanto masculinas, femeninas o de ambos.

La Reproducción asistida corresponde al conjunto de técnicas y tratamientos médicos destinados a favorecer el embarazo mediante metodologías que facilitan o sustituyen a los procesos naturales que se dan durante la reproducción.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Ácido Docosahexaenoico (DHA)

El ácido Docosahexaenoico es un ácido graso poliinsaturado que pertenece a la serie de los PUFAs Ω 3. Se sintetiza por las microalgas marinas y está presente en el aceite de pescado.

El DHA actúa positivamente a la hora de favorecer la fluidez y la permeabilidad de las membranas celulares. Está descrito en la bibliografía al efecto de la suplementación en la dieta con PUFAs n-3 sobre la reducción en la producción de radicales libres en humano y su capacidad para limitar la lipoperoxidación.

El DHA ejerce una acción protectora antioxidante al actuar como eliminador de las especies reactivas en oxígeno (ROS) reaccionando directamente con ellas. Además, también ejerce esta función al inducir la activación y/o incremento de la expresión génica de las enzimas con acción protectora antioxidante.

La capacidad fertilizante del hombre está relacionada con el restablecimiento de las defensas enzimáticas antioxidantes del espermatozoide mediada por la suplementación dietética con DHA.

Numerosos estudios previos ponen de manifiesto que el daño de la membrana y del ADN que se observa en espermatozoides eyaculados se produce sobre todo en el ámbito post testicular durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo. Este daño es inducido, en su mayor parte, por radicales libres y amplificado por factores proinflamatorios. Pone de manifiesto por primera vez la eficacia y la seguridad del ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso poliinsaturado de cadena larga con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, en el tratamiento de la infertilidad masculina asociada a daño de membrana y del ADN espermático. En el tratamiento de la infertilidad masculina asociada a daño de membrana y del ADN espermático (Álvarez JG, 2011).

No solo como sustancia reparadora de posibles daños, también otros estudios recogen un aumento significativo en el volumen de semen y el número total de espermatozoides en otras especies como jabalíes complementados diariamente, dando como resultado un aumento en la producción de 3 a 4 dosis más por eyaculado. (Murphy *et al.*, 2017).

Los hombres infértiles tenían concentraciones más bajas de ácidos grasos $\Omega 3$ en los espermatozoides que los hombres fértiles. Estos resultados sugieren que se debe realizar una investigación para evaluar los beneficios potenciales de la suplementación con Ω -3 FA como un enfoque terapéutico en hombres infértiles con oligoastenoteratozoospermia idiopática (OAT) (Safarinejad MR *et al.*, 2010).

En nuestro estudio, obtenemos DHA por parte de EUKID®, un complemento alimenticio para niños a base de aceite vegetal procedente de la microalga *Schizochytrium* sp, rico en ácido docosahexaenoico (DHA), ácido graso Ω -3 que se encuentra de forma natural en todo el organismo, pero de manera más abundante en el cerebro (97% de los Ω -3), ojos (93%) y corazón. El DHA es muy importante para el desarrollo y funcionamiento sano del cerebro y los ojos, y se ha demostrado que ayuda a mantener el corazón sano desde la infancia hasta la edad adulta. Aunque es un

complemento alimenticio para niños y vendido como tal, para ese sector infantil; el beneficio lo centran en la mejora del desarrollo y funcionamiento de otros órganos, utilizamos esta sustancia en concentraciones estimadas, según las referencias bibliográficas utilizadas, que puedan favorecer al beneficio para la infertilidad masculina.

2.2.2 Ácido ursólico

El ácido ursólico es un compuesto triterpénico pentacíclico, es decir, de 30 carbonos que está conformado por 5 anillos. Este compuesto se encuentra en varias especies vegetales, y en la mayoría de los casos aparece junto a su isómero, el cual se denomina ácido oleanólico. Se ha encontrado que tiene varios efectos biológicos como sedación, antiinflamatorio (Kashyap *et al.*, 2016), antibiosis, antidiabético, antiulceroso, anticancerígeno (Yin R *et al.*, 2018) y antimicrobiano. Nos centraremos en su efecto antiinflamatorio.

2.2.3 Pesticidas: cipermetrina

La exposición a pesticidas afecta a muchos órganos del cuerpo, incluido el sistema reproductivo. El trastorno del sistema reproductivo conduce a la infertilidad y, por lo tanto, ha estado en el centro de atención en las últimas décadas. Los pesticidas son uno de los compuestos que pueden reducir la calidad del semen en los trabajadores expuestos de acuerdo con el conocimiento actual. Aunque se han propuesto muchos mecanismos subyacentes, los mecanismos de acción aún no están aclarados.

La mayoría de los pesticidas, incluidos los organofosforados, afectan al hombre, perjudicando al sistema reproductivo por mecanismos tales como reducción de la densidad y motilidad del esperma, inhibición de la espermatogénesis, reducción del peso de los testículos, reducción del conteo de espermatozoides, motilidad, viabilidad y densidad, e inducción de daño en el ADN del esperma, y aumento de la morfología anormal del esperma. Peso reducido de los testículos, epidídimo, vesícula seminal y próstata ventral, degeneración de los túbulos seminíferos, cambio en los niveles plasmáticos de testosterona, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), nivel disminuido y actividad de las enzimas antioxidantes en los testículos y la esteroidogénesis testicular inhibida son

otros mecanismos posibles. Además, el DDT y sus metabolitos tienen efectos estrogénicos en los hombres (Mehrpour O. *et al.*, 2014).

En particular nos centraremos en la cipermetrina. La cipermetrina es un insecticida piretroide sintético ampliamente utilizado y considerado como un potencial disruptor endocrino. Se conoce que tras la recogida de los cultivos, su alta incidencia hace que notables cantidades contaminen al fruto y por consiguiente, llegan de forma directa a nosotros tras el consumo. La exposición a la cipermetrina puede suponer un gran riesgo para la salud humana, incluido un efecto adverso en sus funciones reproductivas. Estudios indican que a lo largo del desarrollo se observó una alteración significativa en la histología testicular, la expresión de los receptores de hormonas esteroides y las hormonas esteroides circulatoria. Se observó una disminución del recuento de espermatozoides y la motilidad en ratas adultas (Singh D. *et al.*, 2017).

El recuento de espermatozoides epididimales y testiculares, así como la producción diaria de espermatozoides, disminuyeron significativamente en los machos expuestos. Los niveles séricos de testosterona, hormona estimulante del folículo y hormona luteinizante se redujeron significativamente en los hombres expuestos (Elbetieha, A *et al.*, 2001).

2.3 Evaluación seminal

2.3.1 Parámetros rutinarios de análisis

La evaluación de la calidad seminal es una parte importante en el estudio de la infertilidad y un punto crítico en los proceso de reproducción asistida. Por una parte, machos con una fertilidad reducida presentan alteraciones detectables mediante un examen rutinario del semen. No obstante, debemos tener siempre en consideración que aunque es necesaria una buena calidad seminal para alcanzar unos niveles de fertilidad aceptables, no todos las muestras seminales con buena calidad seminal mantienen niveles de fertilidad dentro de la normalidad.

El seminograma, espermiograma o espermatograma es una prueba diagnóstica cuyo objetivo es evaluar la calidad del semen y sus características:

- Examen macroscópico: volumen, pH, color...

- Examen microscópico: morfología, movilidad, vitalidad...

El estudio fue realizado en semen porcino. El volumen de espermatozoides eyaculados según esta especie es de 20 ml (Tabla 1).

ESPECIE	VOLUMEN (ml)	No de spz (10^9)
FELINO	0.05	0.01
BOVINO	5	6
CANINO	5	1.8
CAPRINO	1	2.4
COBAYO	0.2	0.06
EQUINO	6	10
RATON	0.1	0.06
PORCINO	20	48
CONEJO	0.5	0.03
RATA	0.1	0.06

Tabla 1. Volumen y cantidad de espermatozoides eyaculados en diferentes especies

A continuación se muestran parámetros del análisis macroscópico (Tabla 2):

	4ª edición (1999)	5ª edición* (2010)
Licuefacción	Total a los 60min	Total a los 60min
Volumen	2ml	1.5ml
Color	Blanco opalescente	Blanco opalescente
pH	7.2-7.8	>7.1
Concentración (ml)	20 millones	15 millones
Móviles progresivos	50%	32%
Vitalidad	75%	58%
Morfología	15%	4%
Leucocitos (ml)	< 1 millón	< 1 millón
Mar test	<50% esp. Unidos a partículas	<50% esp. Unidos a partículas

Tabla 2. Valores del límite de referencia inferior (LRI) según la OMS utilizados en la actualidad en los centros especializados en fertilidad

El análisis en el que nos centramos es en el microscópico, estudiando parámetros tales como la motilidad, vitalidad y morfología.

2.3.2 Principios de las técnicas

Tanto la técnica de fragmentación de ADN como la de especies ROS fueron realizadas mediante dos métodos diferentes cada una de ellas, las cuales se explican en cada apartado.

2.3.2.1 Fragmentación de ADN

Las pruebas de fragmentación de ADN espermático aportan información clínicamente relevante tanto para la concepción natural como la artificial (técnicas de reproducción asistida), independientemente de los parámetros rutinarios a analizar (análisis macroscópicos, microscópicos).

Estudios que tienen como objetivo investigar el efecto de la fragmentación del ADN espermático sobre la tasa de fertilización, el desarrollo de embriones (tasa de blastulación) y los resultados del embarazo para los ciclos de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), han determinado que la fragmentación del ADN espermático tuvo una correlación negativa con las tasas de blastulación y embarazo incluso con ovocitos de buena calidad. Los altos niveles de daño en el ADN promovieron la detención del embrión e indujeron la activación de la maquinaria apoptótica (Álvarez *et al.*, 2017). Por esta razón, se ha tomado como técnica a usar en este estudio ya que nos aporta datos de interés con respecto al daño del material genético del espermatozoide y su consiguiente funcionalidad.

La primera metodología realizada dentro de esta técnica es la que toma como base la utilización de azul de toluidina (TB). El TB es un colorante metacromático que muestra tanto la calidad como la cantidad de condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide / fragmentación del ADN mediante la unión al fosfato del ADN.

En el segundo método fue utilizado un kit. Los kits Halomax® de Halotech DNA irrumpen en el mercado como un producto pionero para el análisis de los niveles de fragmentación de ADN en espermatozoides, tanto en animales domésticos como en animales de experimentación. Sus- halomax® ha sido diseñado para una evaluación rápida de la fragmentación de espermatozoides de ADN en muestras de espermatozoides frescos o congelados / descongelados.

Ambas metodologías poseen la misma evaluación y fundamento, aun así se hicieron para poder comparar y verificar datos con distintas técnicas. Se basa en la respuesta diferencial de la cromatina de espermatozoide con o sin ADN fragmentado a un tratamiento de reducción de proteínas. En ausencia de una rotura masiva del ADN, la

eliminación de las proteínas nucleares produce nucleoides teñidos intensamente con halos muy pequeños de lazos de ADN que emergen de un núcleo central y compacto. Sin embargo, los nucleoides de espermatozoides que contienen ADN fragmentado muestran un halo grande y ligeramente teñido de difusión de fragmentos de ADN que emergen de un núcleo central residual.

2.3.2.2 *Especies ROS*

La presencia de especies destructivas de oxígeno reactivo (ROS), un concepto que se asocia al estrés oxidativo, se produce cuando las defensas antioxidantes naturales no pueden bloquear las ROS activas. El buen resultado es que se produce daño celular a diferentes niveles. Las células somáticas y de la línea germinal pueden ser objetivos de ROS. Cuando afecta a las células de la línea germinal, un exceso de estrés oxidativo tiene un impacto directo en la fertilidad masculina (Aitken y De Iuliis, 2010).

Una serie de ensayos sensibles para la evaluación de diferentes niveles de ROS y moléculas responsables de la producción de estrés oxidativo están ahora bien establecidas, pero no son utilizadas frecuentemente por los laboratorios clínicos de andrología. Oxisperm®, primer método utilizado, proporciona al clínico un ensayo fácil, confiable y bien establecido para medir un posible exceso de aniones superóxido presentes en la eyaculación. La prueba se basa en el ensayo de tetrazolio de la pista nitro (NBT), en forma de un gel reactivo (RG) en el kit Oxisperm®. El ensayo NBT se basa en la capacidad del agua en la sal de tetrazolio soluble que se convierte por la acción de los aniones superóxido en un cristal azul insoluble en agua, que se conoce como formazan (Baehner *et al.*, 1976). En los espermatozoides, los productos de esta reacción se unen a las membranas de los espermatozoides y se pueden visualizar fácilmente bajo microscopía. Estos cristales producen y aumentan la intensidad del color en el RG (desde el amarillo hasta los diferentes niveles de púrpura-azul), que pueden cuantificarse de forma fácil y comparativa a simple vista mediante el uso de una escala de color. Alternativamente, se puede usar un colorímetro para medir la absorbancia de longitudes de onda que van desde 530 nm a 630 nm. La intensidad del color está relacionada con el nivel de estrés oxidativo (exceso de aniones superóxido) en la muestra.

El otro método utilizado para la evaluación del estado de la membrana plasmática es mediante la Merocianina 540 (M540). Es una tinción hidrofóbica y lipofílica muy sensible a los cambios en la conformación de la membrana, usada para monitorizar la desorganización lipídica de la membrana celular. Posteriormente se medirá mediante citometría de flujo.

2.4 Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivos evaluar el efecto potencial de la cipermetrina en los espermatozoides porcinos y los posibles efectos de mejora con la adición de sustancias antiinflamatoria y antioxidante como el ácido ursólico y ácido Docosahexaenoico (DHA), ácido graso poliinsaturado $\Omega 3$, que forma parte de las membranas celulares del organismo. Analizar la calidad seminal de los diferentes grupos experimentales mediante los parámetros microscópicos y técnicas como la fragmentación del ADN y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de material y muestras

Muestra de esperma

La muestra de semen porcino proviene de Semen Cardona S.L., compañía internacional, especializada en la elaboración de dosis para inseminación artificial porcina de alto rendimiento. Las muestras de semen fresco fueron recogidas en un recipiente estéril.

3.2 Diseño experimental

Grupo 1: ácido ursólico y cipermetrina (aplicación del pesticida a la muestra seminal 1 hora antes de adicionar posteriormente el tratamiento)

Grupo 2: DHA y cipermetrina (1 hora antes, de igual modo que en el caso anterior)

Grupo 3: cipermetrina

Grupo 4: ácido ursólico

Grupo 5: DHA

Grupo 6: control negativo (únicamente muestra de semen junto con medio, sin tratamiento alguno)

Contenido de cada grupo experimental en cada eppendorf:

- 200 μ L de esperma
- 700 μ L de medio
- 100 μ L de DHA o ácido ursólico, según corresponda a un grupo u otro
- 50 μ L pesticida: cipermetrina

Todos los grupos poseen replicas actuando el pesticida y los diferentes tratamientos durante 24 y 72 horas.

3.3 Análisis microscópico

a) Motilidad

La motilidad espermática se evalúa mediante la observación en un microscopio de campo claro o de contraste fases a 100 -200 aumentos de una muestra de 10 μ L de semen depositado sobre cámara de Neubauer precalentada en una placa termostatzada a 39°C.

Se valora el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100 %) y el tipo de movimiento rectilíneo, progresivo y rápido en una escala de 0 a 5.

En el mismo campo podemos observar también la presencia de aglutinaciones (Figura 1).

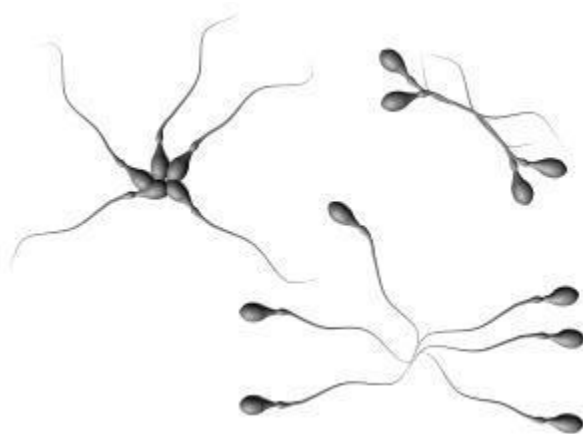


Figura 1. Tipos de aglutinaciones

Y podemos valorar la presencia de bacterias, otras células, debris celular.

Tipos de motilidad:

- ☐ Tipo a: movilidad rápida y progresiva, > 25 micrometros/segundo a 37°C, 5 veces la cabeza en 1 segundo.
- ☐ Tipo b: movilidad progresiva lenta o perezosa
- ☐ Tipo c: movilidad no progresiva, < 5 micrometros/segundo, 1 vez la cabeza por segundo
- ☐ Tipo d: inmóvil

Se realiza el conteo de 100 espermatozoides por porta. Determinando el porcentaje (Fórmula 1). Valores de referencia: una motilidad del 80-95%,

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

Fórmula 1. Determinación de motilidad espermática en porcentaje

b) Vitalidad espermática

Se realiza mediante tinción de eosina-nigrosina.

Procedimiento tinción.

Volúmenes iguales de semen y tinción fueron mezclados.

1. Añadir 50 µl de eosina-nigrosina a 50 µl de semen en un microtubo eppendorf y mezclar bien.
2. Después de 30 segundos a T^a ambiente, transferir una gota de 12 µl de la mezcla sobre un portaobjetos y realizar un frotis.
3. Dejar que el portaobjetos se seque al aire.
4. Colocar una gota de medio de montaje y cubrir con un cubreobjetos 22×50mm
5. Examinar el portaobjetos bajo objetivo de 100× con aceite de inmersión

Resultados (Figura 2):

- 1) Los Espermatozoides vivos se quedan sin teñir (membrana intacta) y espermatozoides muertos tiñen de color rosa o rojo (membrana dañada)
- 2) Evaluar al menos 200 espermatozoides, y se calculará el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos
- 3) El límite inferior de referencia para evaluar la vitalidad de la tinción eosina-nigrosina (membrana intacta espermatozoides) es del 58%

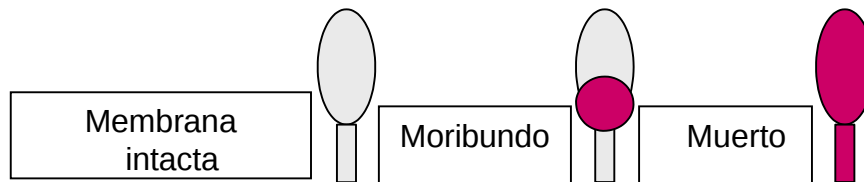


Figura 2. Representación gráfica de la interpretación de los resultados obtenidos con la tinción eosina-nigrosina.

Resultados:

Se expresa el porcentaje de células con las membranas intactas (células blancas)

Tinción de Eosina-nigrosina:

- 1) Disolver 0,67 g eosina y 0,9 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada de agua en un vaso de precipitados de vidrio colocado en una placa caliente de agitación.
- 2) Calentar suavemente y añadir 10,0 g nigrosina y disolverla antes de que hierva. Una vez se alcance ebullición, retirar el vaso de la placa caliente, y dejar enfriar a temperatura ambiente. Colar con filtro de papel, y almacenar a 4 ° C en un frasco de vidrio

c) Morfología

Técnica de tinción recomienda: hematoxilina (mezclar en eppendorf 20 µl de semen +20 µl de colorante), previamente filtrado el colorante. Tomar una gota sobre portaobjetos y poner cubreobjetos

- Analizar cabeza, pieza intermedia y cola
- Deben de evaluarse 100 espermatozoides.
- Observar con objetivo de inmersión.
- Sólo se cuentan los espermatozoides completos

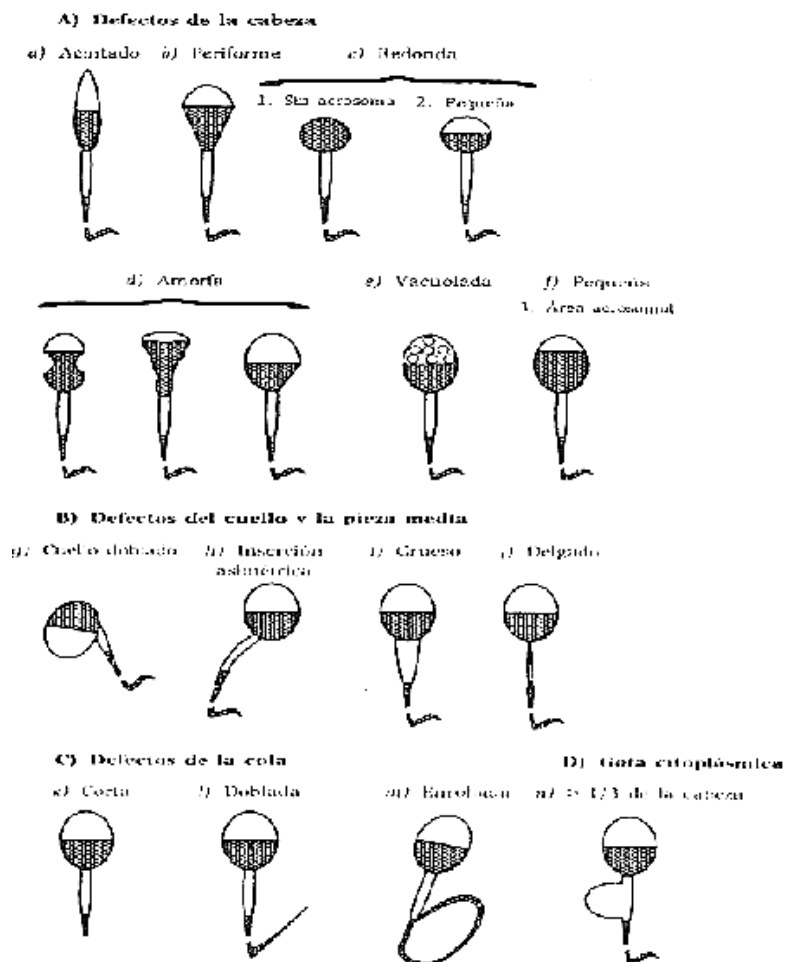


Figura 3. Diferentes tipos de morfología anormal de los espermatozoides

Valores de referencia: un porcentaje de morfoanomalías (Figura 3) inferior al 20%.

3.4 Estudio de la fragmentación de ADN

Para el estudio de la fragmentación de ADN, como se ha indicado con anterioridad, se realizaron dos metodologías. Cada metodología fue aplicada en un periodo de tiempo diferente. Primer método, azul de toluidina se realizó a las 24 horas de estar la cipermetrina y los tratamientos actuando (según el grupo experimental) y

en el caso del segundo método, kit Halomax® de Halotech DNA, se realizó a las 72 horas de contacto de las muestras con la cipermetrina y los tratamientos. De este modo, se pudo estudiar a lo largo del paso del tiempo como el contacto con esas sustancias afectaba tanto a la calidad como la cantidad de condensación de la cromatina nuclear del esperma / fragmentación del ADN mediante la unión al fosfato al ADN.

Azul de toluidina: los frotis de esperma secados al aire se fijaron en etanol fresco al 96% y acetona (1:1) a 4°C durante 30 min y luego se incubaron en HCl 0,1 N a 4°C durante 5 min. Después de eso, las muestras se lavaron 3 veces con agua destilada durante 2 min y finalmente se tiñeron con 0,05% de TB en tampón McIlvaine (fosfato citrato) durante 10 min a temperatura ambiente.

Nivel de tinción:

- 0, azul claro (buena cromatina)
- 1, azul oscuro (cromatina anormal leve)
- 2, violeta y 3, púrpura (anomalía grave de la cromatina)

En cada muestra, al menos 50 espermatozoides se contarán bajo microscopía óptica. Tampón McIlvaine: 6,44 mg del fosfato bisódico y 13,56 mg de ácido cítrico (pH=3.5) en 1000 ml.

Descripción, en específico, de los reactivos del kit y a continuación, pasos a seguir:

- 5 SCS (diapositivas recubiertas especiales de 8 pocillos)
- 5 ACS (soporte celular de agarosa)
- 1 LS (solución de lisis)
- 1 flotador

Incluir muestra de esperma en microgel de agarosa

1. Adaptar la solución de lisis a la temperatura ambiente (22°C)
2. Diluir la muestra de esperma para que se encuentre a una concentración de 15-20 millones de espermatozoides por mililitro.

3. Colocar en un tubo eppendorf (ACS), que contenga agarosa (500 μ L), en el flotador e incubar en un baño de agua a 95-100°C durante 5 minutos o hasta que la agarosa esté completamente fundida. Alternativamente, se podría utilizar un microondas.
4. Colocar el tubo eppendorf de agarosa, con el flotador, en un baño de agua a 37°C y dejarlo durante 5 minutos hasta que la temperatura se haya equilibrado.
5. Mientras tanto, transferir alícuota de 25 μ L de cada muestra de esperma en un tubo eppendorf vacío.
6. Transferir 50 μ L de agarosa licuada al tubo con la muestra de semen y mezclar suavemente. Mantener los tubos a 37°C.
7. Colocar una gota de 1.5-2 μ L de la suspensión celular en los pozos del portaobjetos y cubrir 4 pozos con un cubreobjetos de vidrio de 24x24 mm. Presionar suavemente, evitar la formación de burbujas de aire.
8. Los portaobjetos deben mantenerse en posición horizontal durante todo el proceso.
9. Colocar el portaobjetos sobre una superficie fría (por ejemplo, una placa de metal o vidrio previamente enfriada a 4°C) y llevar a la nevera a 4°C, durante 5 minutos para solidificar la agarosa.

Tratamiento de la muestra de esperma

10. Sacar el portaobjetos de la nevera y retirar el cubreobjetos, deslizarlo suavemente. Todo el proceso debe realizarse a temperatura ambiente (22°C).
11. Colocar el portaobjetos horizontalmente en una placa de Petri o una bandeja similar.
12. Aplicar LS sobre los pozos asegurándose de que estén completamente sumergidos. Incubar durante 5 minutos. Escurrir inclinando y colocarlo de nuevo horizontalmente.
13. Lavar cubriendo el portaobjetos durante 5 minutos con abundante agua destilada con una pipeta desechable. Escurrir inclinando y colocar el portaobjetos de nuevo horizontalmente.

14. Deshidratar cubriendo con etanol al 70%, usar una pipeta desechable e incubar durante 2 minutos. Escurrir y aplicar etanol al 100% durante 2 minutos. Escurrir y dejar secar.

15. Después del secado, los portaobjetos pueden mantenerse almacenados/guardados a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro durante varios meses.

Tinción y visualización

Pasar a teñir el portaobjetos justo antes de la visualización y el análisis bajo microscopía de fluorescencia con fluorocromos de alta sensibilidad. Por ejemplo, preparar algún fluorocromo de la familia SyberGreen, a una concentración final de 40x en agua destilada y luego mezclar 1:1 en un medio de montaje antideslizante como Vectashield (recomendación).

Un volumen final mezclado de 2 μ L es suficiente para teñir cada pocillo.

3.5 Especies ROS

De igual modo que para la fragmentación de ADN, el estudio de especies ROS también se realizó durante dos periodos de tiempo (24 y 72 h respectivamente):

Primera metodología con Merocianina 540 (24 horas de contacto con cipermetrina con o sin tratamiento en el esperma):

Para detectar incrementos de la desorganización de la membrana plasmática, recoger los espermatozoides en diferentes eppendorfs, allí añadir el fluorocromo, previamente preparado con PBS, cada eppendorf con 6 μ l de M540 1mM y dejar incubar en oscuridad durante 15 min a 37°C. Posteriormente, analizar las muestras por el citómetro de flujo a una absorbancia de 540 nm para ver el grado de fluorescencia en función de la desorganización plasmática.

Mediante el kit (segunda metodología realizada):

1. Colocar el tubo con el gel reactivo (RG), utilizando el flotador en un vidrio de precipitación, y calentar durante 1 minuto en un microondas a máxima potencia. Alternativamente, el RG se puede licuar en un baño de agua a 90°C durante aproximadamente 5 minutos.
2. Reducir la temperatura del RG a 37°C, utilizar un baño de agua o en un horno a 37°C.
3. Mezclar el RG con la muestra de semen en uno de los tubos eppendorf incluidos. Evitar burbujas en la mezcla resultante.
4. Gelificar la mezcla a 4°C durante 5 min.
5. Incubar durante 45 minutos a 37°C y comparar el color de la muestra con el esquema de color.

3.6 Análisis estadístico

Los datos fueron tratados mediante la prueba t de Student, mediante el uso de hojas de cálculo de Microsoft Excel 2013. Se obtuvieron resultados significativos a un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0.05$) para todos los parámetros analizados.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis microscópico.

- Grupo 1: Ursólico y pesticida (1 hora antes) (Tabla 3)

<i>n</i> = 100	24 h	72 h
<i>Vitalidad</i>	Membrana intacta 38	Membrana intacta 22
	Moribundo 62	Moribundo 78
	Muertos 0	Muertos 0
<i>Morfología</i>	Spz completos 20	Spz completos 60
	Defecto cabeza 50	Defecto cabeza 0
	Defecto cuello 3	Defecto cuello 0
	Defecto cola 27	Defecto cola 40
<i>Movilidad</i>	Tipo a (rápida y progresiva) 0	Tipo a (rápida y progresiva) 0
	Tipo b (progresiva lenta o perezosa) 10	Tipo b (progresiva lenta o perezosa) 0
	Tipo c (no progresiva) 15	Tipo c (no progresiva) 0
	Tipo d (inmóvil) 75	Tipo d (inmóvil) 100

Tabla 3. Resultados análisis seminal básico grupo experimental 1 (Ursólico y pesticida)

- Grupo 2: DHA y pesticida (1 hora antes) (Tabla 4)

<i>n</i> = 100	24 h	72 h
<i>Vitalidad</i>	Membrana intacta 42	Membrana intacta 25
	Moribundo 58	Moribundo 75
	Muertos 0	Muertos 0
<i>Morfología</i>	Spz completos 12	Spz completos 55
	Defecto cabeza 58	Defecto cabeza 0
	Defecto cuello 0	Defecto cuello 0
	Defecto cola 30	Defecto cola 55
<i>Movilidad</i>	Tipo a (rápida y progresiva) 0	Tipo a (rápida y progresiva) 0
	Tipo b (progresiva lenta o perezosa) 1	Tipo b (progresiva lenta o perezosa) 0
	Tipo c (no progresiva) 90	Tipo c (no progresiva) 0
	Tipo d (inmóvil) 9	Tipo d (inmóvil) 100

Tabla 4. Resultados análisis seminal básico grupo experimental 2 (DHA y pesticida)

- Grupo 3: Pesticida (Tabla 5)

<i>n</i> = 100	24 h	72 h
<i>Vitalidad</i>	Membrana intacta 2	Membrana intacta 3
	Moribundo 98	Moribundo 92
	Muertos 0	Muertos 5
<i>Morfología</i>	Spz completos 2	Spz completos 67
	Defecto cabeza 57	Defecto cabeza 30
	Defecto cuello 1	Defecto cuello 1
	Defecto cola 40	Defecto cola 2
<i>Movilidad</i>	Tipo a (rápida y progresiva) 0	Tipo a (rápida y progresiva) 0
	Tipo b (progresiva lenta o perezosa) 0	Tipo b (progresiva lenta o perezosa) 0
	Tipo c (no progresiva) 20	Tipo c (no progresiva) 0
	Tipo d (inmóvil) 80	Tipo d (inmóvil) 100

Tabla 5. Resultados análisis seminal básico grupo experimental 3 (pesticida)

- Grupo 4: Ácido ursólico (Tabla 6)

<i>n</i> = 100	24 h		72 h	
<i>Vitalidad</i>	Membrana intacta	68	Membrana intacta	86
	Moribundo	28	Moribundo	12
	Muertos	4	Muertos	2
<i>Morfología</i>	Spz completos	88	Spz completos	88
	Defecto cabeza	0	Defecto cabeza	0
	Defecto cuello	0	Defecto cuello	0
	Defecto cola	14	Defecto cola	12
<i>Movilidad</i>	Tipo a (rápida y progresiva)	0	Tipo a (rápida y progresiva)	0
	Tipo b (progresiva lenta o perezosa)	0	Tipo b (progresiva lenta o perezosa)	0
	Tipo c (no progresiva)	0	Tipo c (no progresiva)	0
	Tipo d (inmóvil)	100	Tipo d (inmóvil)	100

Tabla 6. Resultados análisis seminal básico grupo experimental 4 (Ursólico)

- Grupo 5: DHA (Tabla 7)

<i>n</i> = 100	24 h		72 h	
<i>Vitalidad</i>	Membrana intacta	72	Membrana intacta	87
	Moribundo	28	Moribundo	13
	Muertos	0	Muertos	0
<i>Morfología</i>	Spz completos	72	Spz completos	70
	Defecto cabeza	0	Defecto cabeza	0
	Defecto cuello	2	Defecto cuello	1
	Defecto cola	26	Defecto cola	29
<i>Movilidad</i>	Tipo a (rápida y progresiva)	0	Tipo a (rápida y progresiva)	0
	Tipo b (progresiva lenta o perezosa)	0	Tipo b (progresiva lenta o perezosa)	0
	Tipo c (no progresiva)	10	Tipo c (no progresiva)	0
	Tipo d (inmóvil)	90	Tipo d (inmóvil)	100

Tabla 7. Resultados análisis seminal básico grupo experimental 5 (DHA)

- Grupo 6: Control negativo (Tabla 8)

<i>n</i> = 100	24 h		72 h	
<i>Vitalidad</i>	Membrana intacta	98	Membrana intacta	87
	Moribundo	2	Moribundo	13
	Muertos	0	Muertos	0
<i>Morfología</i>	Spz completos	92	Spz completos	100
	Defecto cabeza	0	Defecto cabeza	0
	Defecto cuello	0	Defecto cuello	0
	Defecto cola	8	Defecto cola	0
<i>Movilidad</i>	Tipo a (rápida y progresiva)	87	Tipo a (rápida y progresiva)	0
	Tipo b (progresiva lenta o perezosa)	5	Tipo b (progresiva lenta o perezosa)	0
	Tipo c (no progresiva)	2	Tipo c (no progresiva)	0
	Tipo d (inmóvil)	6	Tipo d (inmóvil)	100

Tabla 8. Resultados análisis seminal básico grupo experimental 6 (Control negativo)

A continuación se muestran gráficas que aúnan, según el parámetro de estudio, a todos los grupos experimentales para así de este modo visualizarlo en conjunto:

Vitalidad (Gráfica 1)

24 horas de incubación:

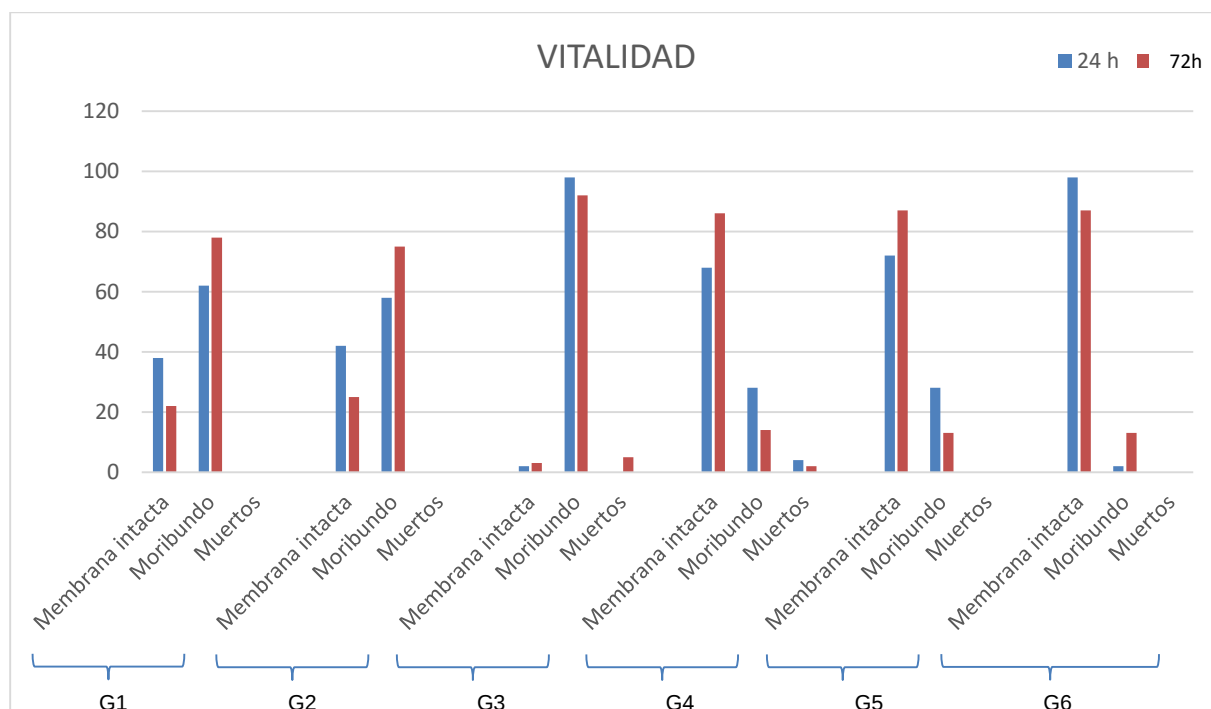
- El tratamiento de DHA junto con pesticida (G2) obtiene mejores resultados que el tratamiento de ácido ursólico con pesticida (G1), el cual posee menos cantidad de espermatozoides con membrana intacta
- Del mismo modo ocurre con los grupos G4 y G5 donde se obtiene mejores resultado en DHA que en ursólico.
- Se obtiene numerosa cantidad de daño (espermatozoides moribundos) en el grupo que posee cipermetrina (G3)
- Observamos valores positivos (membrana intacta) en el grupo control (G6)

Tras 72 horas de incubación:

- Los valores de G2 mejores que los de G1, aunque no se diferencian tanto entre sí como antes, el paso del tiempo ha permitido que en cierto modo los valores se igualen hacia obtener resultados positivos
- En el caso de los tratamientos sin pesticida (ursólico y DHA únicamente) se igualan mucho con respecto al control, obtienen valores de mejora de la calidad seminal al poseer la membrana intacta.

Finalmente indicar las diferencias evidentes entre la incubación de 24 y 72 horas:

- En los grupos 1 y 2, aumenta con el paso del tiempo la cantidad de espermatozoides moribundos y por consiguiente, disminuye la cantidad de espermatozoides con membrana intacta
- Grupo 3, levemente mejora conforme pasa el tiempo
- Grupos 4 y 5 mejoran también con el paso del tiempo de forma algo más evidente
- Grupo 6 (control negativo), se deteriora conforme pasa el tiempo



Gráfica 1. Vitalidad a las 24 y 72 horas de todos los grupos experimentales

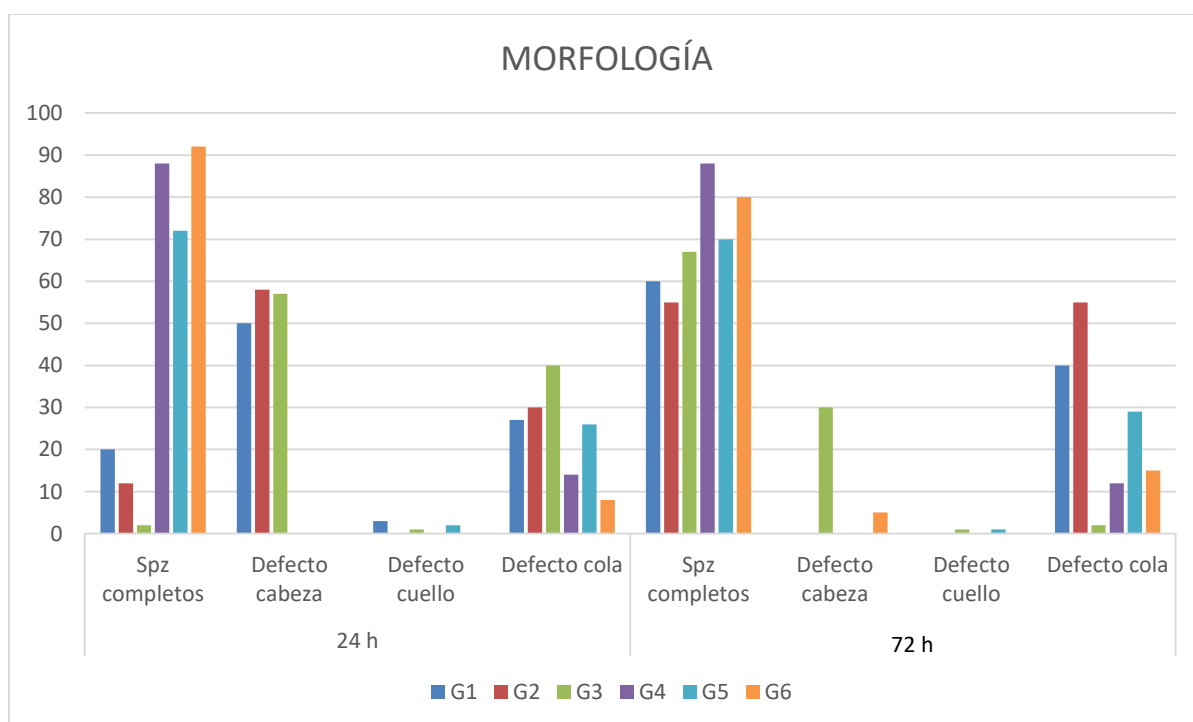
Morfología (Gráfica 2)

Tras 24 horas:

- Grupo con mayor cantidad de espermatozoides completos es el del control negativo (G6)
- G1 y G4 (tratamiento ursólico con y sin pesticida respectivamente) mejores resultados con respecto espermatozoides completos que los grupos con DHA con y sin pesticida (G2 y G3)
- Defectos en cola se producen en los grupos G1, G2 y G3, aquellos que poseen pesticida, siendo de estos tres grupos el G1 el que menos daños sufre
- Defecto en cuello, los valores de daño son muy leves
- Defecto en cola, el que posee el año más evidente es el grupo con pesticida (G3)

Tras las 72 horas de incubación:

- Se aprecia una notable mejoría en todos los grupos experimentales teniendo en todos los grupos mayor cantidad de espermatozoides completos
- Por el contrario, aumentan las cantidades de defectos en cola de los grupos G1, G2, G4 y G5



Gráfica 2. Morfología a las 24 y 72 horas de todos los grupos experimentales

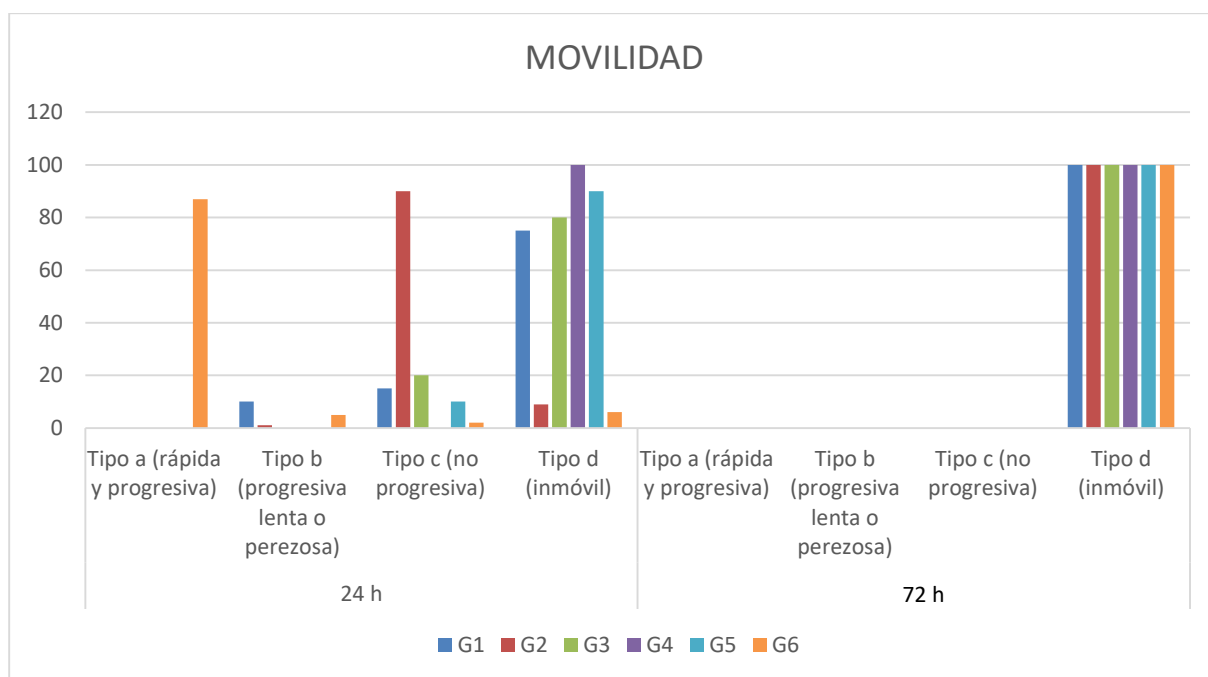
Movilidad (Gráfica 3)

24 horas de incubación

- Único con movilidad rápida y progresiva el G6
- G1, de todos los grupos, el que mayor cantidad de espermatozoides con movilidad progresiva lenta o perezosa posee
- G2 , de todos los grupos, el que mayor cantidad de espermatozoides con movilidad no progresiva
- En su mayoría, todos los grupos poseen inmovilidad; exceptuando G2 y G3 anteriormente descritos.

Tras 72 horas:

- Sea cual sea el grupo, en todos los casos el 100% son inmóviles



Gráfica 3. Movilidad a las 24 y 72 horas de todos los grupos experimentales

De igual modo, a continuación se aporta un glosario de imágenes de todos los grupos experimentales que muestran los resultados de forma visual de las tinciones realizadas. Para visualizar vitalidad tinción de eosina-nigrosina (Figura 4) y para morfología tinción hematoxilina (Figura 5).

Anotación: Todas las fotografías que se muestran del microscopio óptico a partir de ahora, ya sea en este apartado o en los siguientes, fueron tomadas / observadas con el objetivo 40x a excepción de la Figura 10 (b) que fue de 100x.

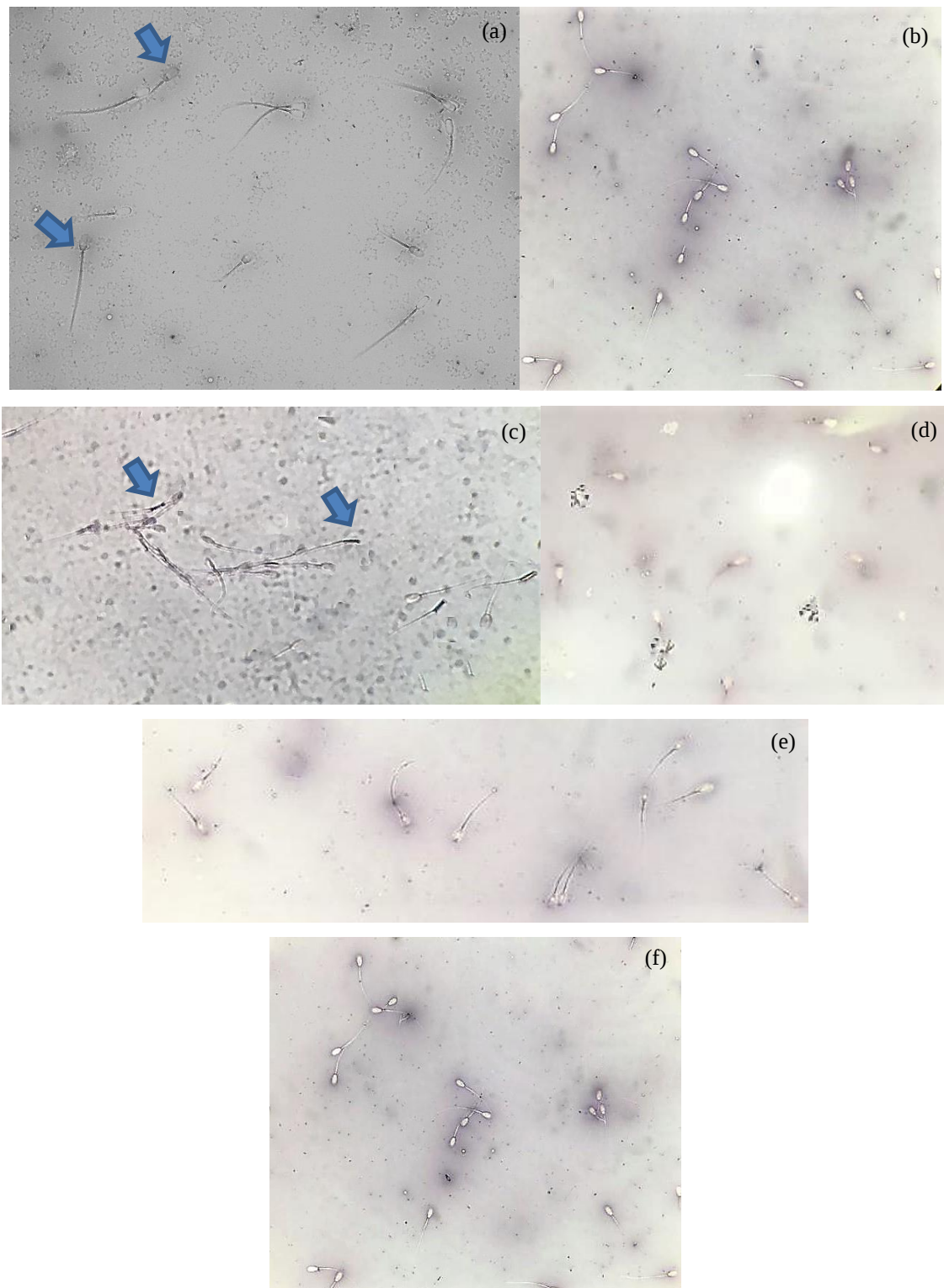


Figura 4. Vitalidad espermática de los grupos experimentales tras 24 horas en contacto con los tratamientos (objetivo 40x). (a) G1 Señalados con flechas dos ejemplos de espermatozoides moribundos, el resto (no teñidos), membrana intacta. (b) G2. Incipiente daño en zona basal en la mayoría, pero de forma muy leve. (c) G3. Señalado con flechas ejemplos de espermatozoides muertos (teñidos). (d) G4. (e) G5. (f) G6. Ningún daño visible en la gran mayoría de estos tres últimos grupos.

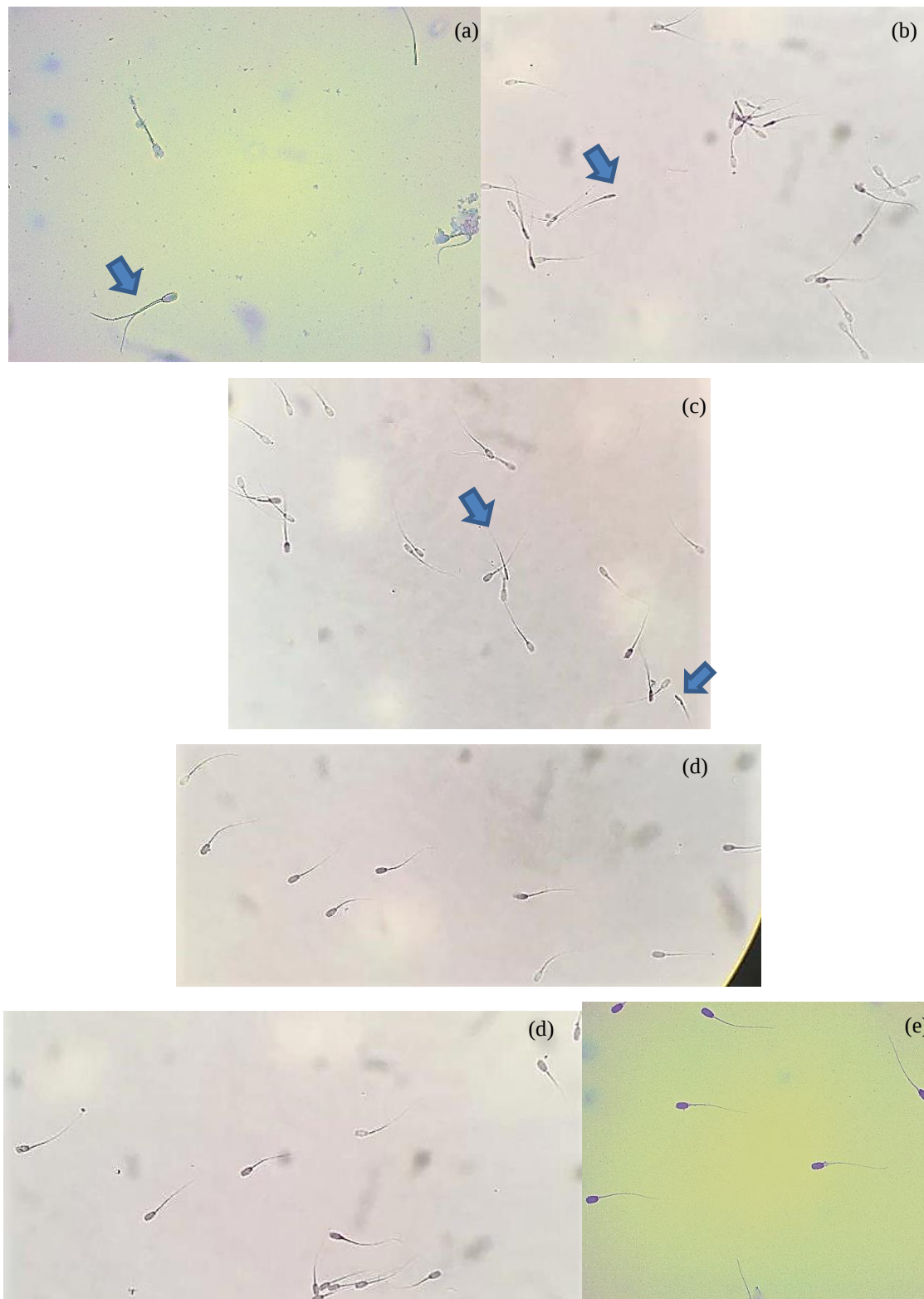


Figura 5. Morfología espermática de los grupos experimentales tras 24 horas en contacto con los tratamientos (objetivo 40x). (a) G1 Señalado con flecha un ejemplo de espermatozoide con doble cola. (b) G2. Señalados con flechas ejemplos de espermatozoides con defecto en cabeza (cabeza aplanada). (c) G3. Señalados con flechas ejemplos de espermatozoides con defecto en cabeza (cabeza aplanada). (d) G4. (e) G5. (f) G6. Ningún daño visible en la gran mayoría de los tres grupos últimos representados.

4.2 Estudio de la fragmentación de ADN

En el caso del método en el que se utilizó como colorante el azul de toluidina y se analizó habiendo pasado 24 horas de incubación:

<i>n</i> = 50	Buena cromatina	Cromatina anormal leve	Anomalía grave de la cromatina
G1	8	40	2
G2	2	44	4
G3	0	49	1
G4	43	7	0
G5	36	14	0
G6	46	4	0

Tabla 9. Resultados contaje según nivel de tinción: buena cromatina (azul claro), cromatina anormal leve (azul oscuro) y anomalía grave de la cromatina (violeta/púrpura).

Clasificación de espermatozoides según el segundo método:

Para el análisis de microscopio usar objetivos de 20x, 40x o 60x. Después del agotamiento de la proteína, los núcleos de espermatozoides aparecen como nucleóides con un núcleo central rodeado por un halo periférico de cromatina / ADN. Se recomienda el análisis de un número mínimo de 300 espermatozoides por muestra. Los criterios de clasificación son los siguientes:

- Espermatozoides con ADN fragmentado: espermatozoides que muestran nucleóides con un halo grande e irregular de dispersión de cromatina (Figura 6).
- Espermatozoides sin ADN fragmentado: espermatozoides que muestran nucleóides con un halo pequeño y compacto de dispersión de cromatina (Figura 6).

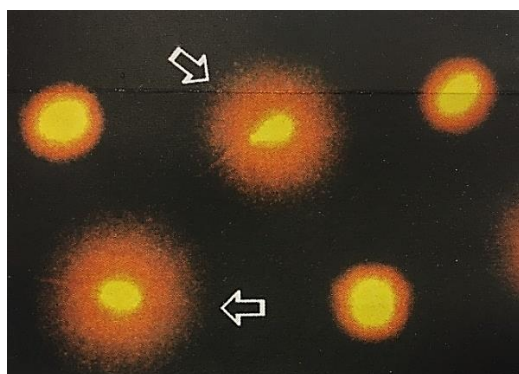
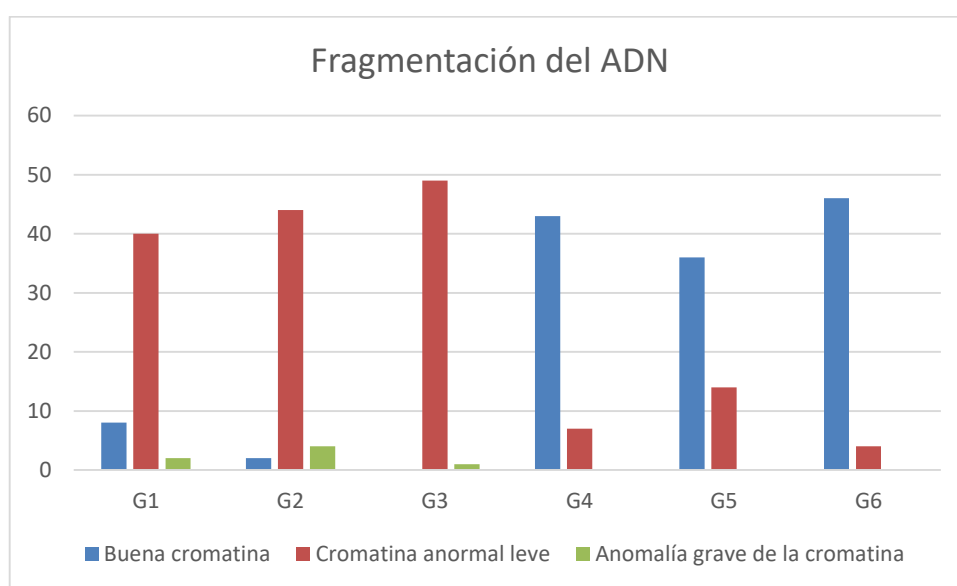


Figura 6. Nucleóides de espermatozoides de cerdo después de ser procesado con Sus-halomax®. Las flechas muestran esos nucleóides con ADN fragmentado.

Con este segundo método (Tabla 9 y gráfica 4), realizado a las 24 horas de contacto con los tratamientos, se aprecia que no existe como tal anomalía grave de la cromatina, únicamente anomalías leves siendo para el G3 el daño mayoritario. Con respecto al G1 se nota una leve mejor calidad que con respecto al grupo G2. En el caso de los grupos experimentales sin cipermetrina, aumenta la buena calidad de la cromatina siendo en el grupo G6 los mejores valores y en el grupo G4 en comparación con el G5.



Grafica 4. Representación fragmentación del ADN

Segundo método, kit Halomax® de Halotech DNA, tras 72 horas de incubación:

$$\text{SDF (\%)} = \frac{\text{Fragmentado+degradado}}{\text{Total células cuantificadas}} \times 100$$

Fórmula 2. Determinación en porcentaje de la fragmentación de AND espermático

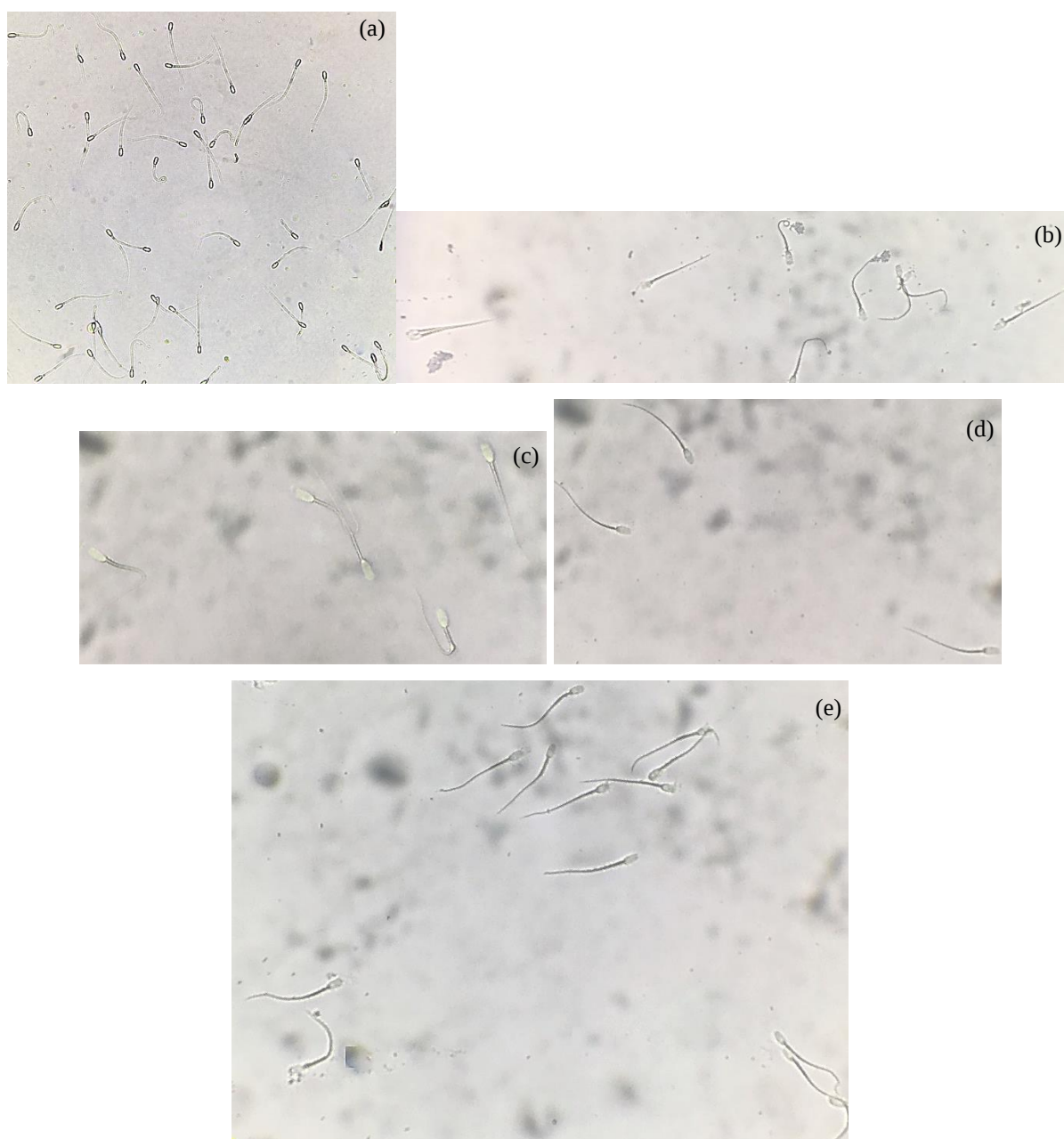


Figura 7. Visualización del estudio de la fragmentación del ADN (objetivo 40x). (a) G3 (b) G6 (C -) (c) G5 (d) G4 (e) G2. En ninguna de ellas se visualiza halo.

Las imágenes aportadas con anterioridad (Figura 7) son las referentes al método realizado con el kit de fragmentación del ADN tras las 72 horas en contacto con los tratamientos y/o cipermetrina, según el grupo experimental indicado. En este apartado no se aporta tabla de datos ya que para todos los grupos experimentales, no hubo presencia de halo y por tanto el porcentaje (Fórmula 2) de fragmentación para todos ellos fue de 0%.

4.3 Especies ROS

El protocolo del kit Oxisperm® indica una escala de cuatro niveles (L) de intensidades, preclasificados en: L1: bajo; L2: bajo-medio; L3: medio; L4: alto (Figura 9).

Visualización al microscopio, según el protocolo, de espermatozoides afectados y no afectados (Figura 8).

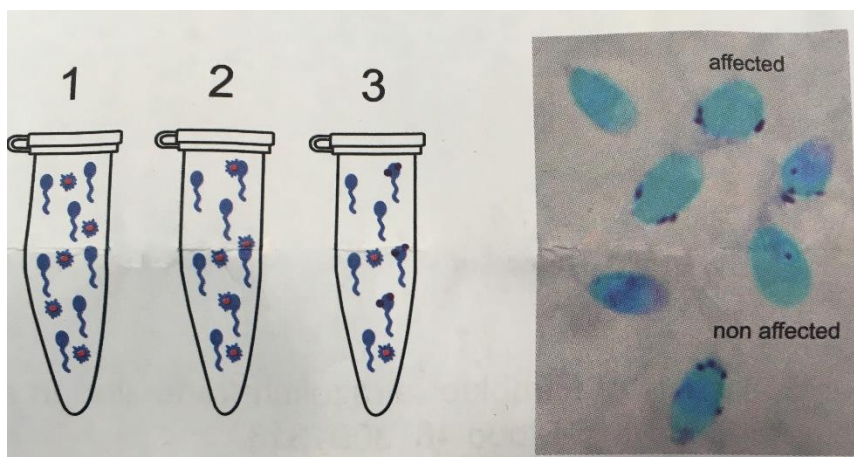


Figura 8. Representación esquemática de la reacción oxidativa y cómo se transforma el espermatozoides después de la transformación del NBT en formazán. La fotografía de la derecha muestra espermatozoides afectados por el O_2 y otros en los que el efecto es nulo. A medida que aumenta la cantidad de moléculas depositadas en la superficie del espermatozoides, aumenta la intensidad del color del RG.



Figura 9. Representación esquemática del nivel de intensidad del color de acuerdo con la capacidad de la muestra de espermatozoides para producir la reacción colorimétrica.

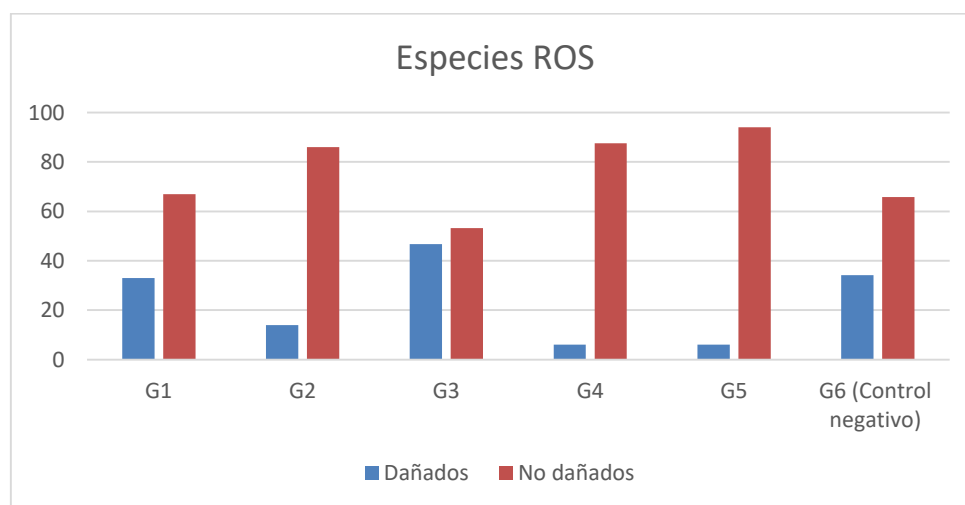
Resultados de producción de especies ROS con el kit Oxisperm® (Tabla 10), realizados a las 72 horas en contacto con los tratamientos. 50 µL gel/ 50 µL muestra semen de cada grupo experimental.

De un conteo de 100 espermatozoides, capacidad del esperma para producir la reacción colorimétrica (en porcentaje):

<i>n</i> = 100	Dañados	No dañados
G1	33	67
G2	14	86
G3	46,8	53,2
G4	12,5	87,5
G5	6	94
G6 (Control negativo)	34,15	65,85

Tabla 10. Porcentaje de espermatozoides dañados/ no dañados mediante técnica de especies ROS
(t (6)=2,57; p=0,011)

El grupo con DHA, ya sea con pesticida o no, posee mejores valores de espermatozoides no dañados que para el grupo con ursólico (con o sin pesticida). Los peores valores son para el G3 y los mejores para aquellos que poseen tratamiento DHA/ ursólico si lo comparamos con el control negativo (G6) en particular y en general con el resto de grupos. (Gráfica 5)



Gráfica 5. Representación resultados especies ROS de todos los grupos experimentales

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) propician la formación de compuestos como O_2 , H_2O_2 y OH^- , de los cuales el último es el que posee mayor reactividad. El acúmulo de estos productos propicia la aparición de lo que se conoce como estrés oxidativo, que tiene como principales consecuencias la oxidación de ácidos grasos, aminoácidos o generar daño en el ADN, provocando anomalías y muerte espermática. Las imágenes tomadas de este método (Figura 10) eran todas muy semejantes, la mayoría de ellas poseían espermatozoides afectados, con cantidad de moléculas depositadas en la superficie del esperma. Se adjunta un ejemplo representativo y otra imagen ampliada (objetivo 100x) para visualizarlo con más detalle, ya que fue muy común en la observación.

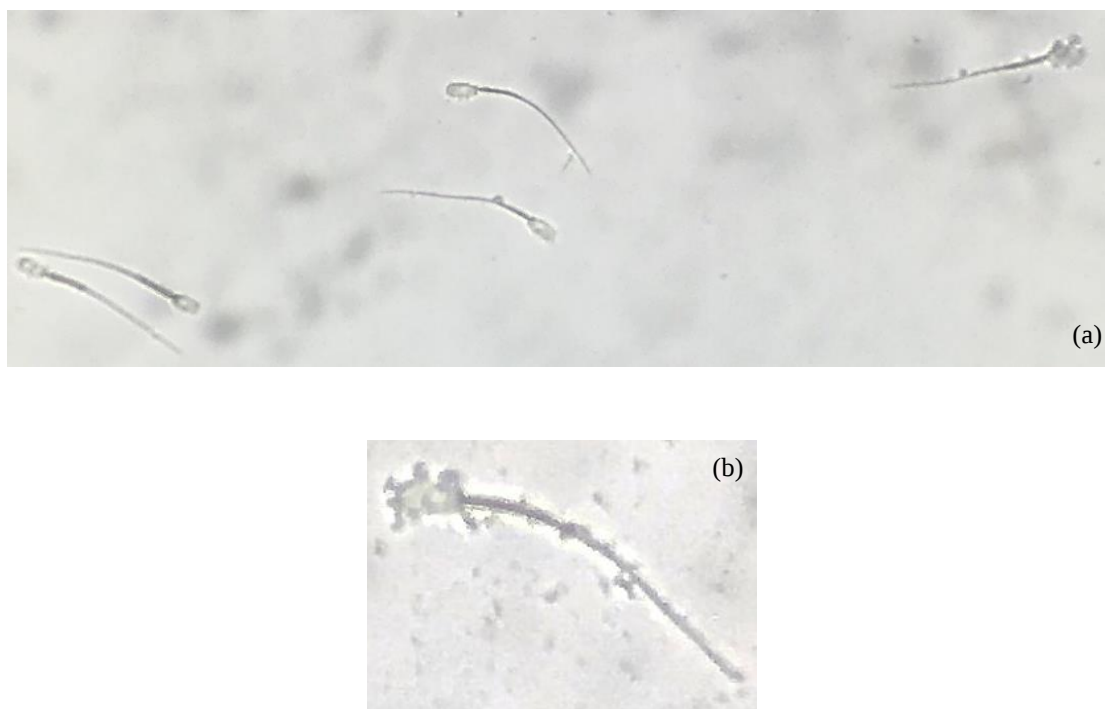
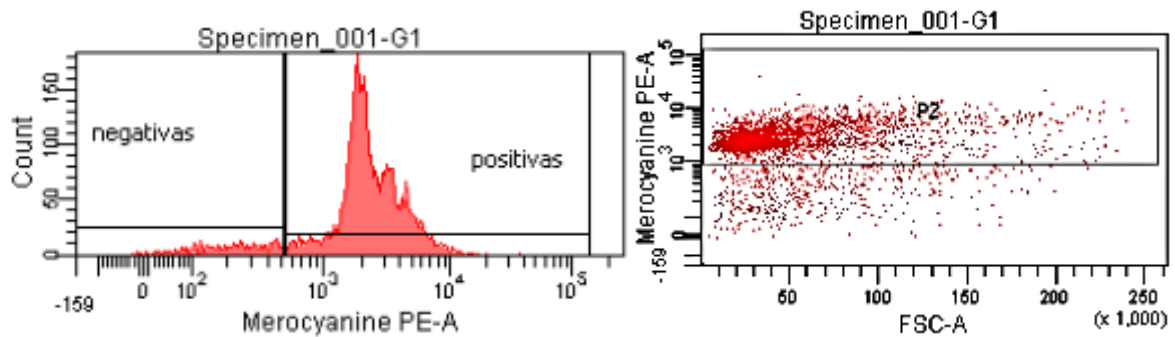


Figura 10. Visualización del estudio de especies ROS. (a) Objetivo 40x (b) Objetivo 100x

A continuación se muestra en otro apartado diferente, el análisis/resultados de daño de membrana realizada tras 24 h de incubación mediante la técnica de citometría de flujo.

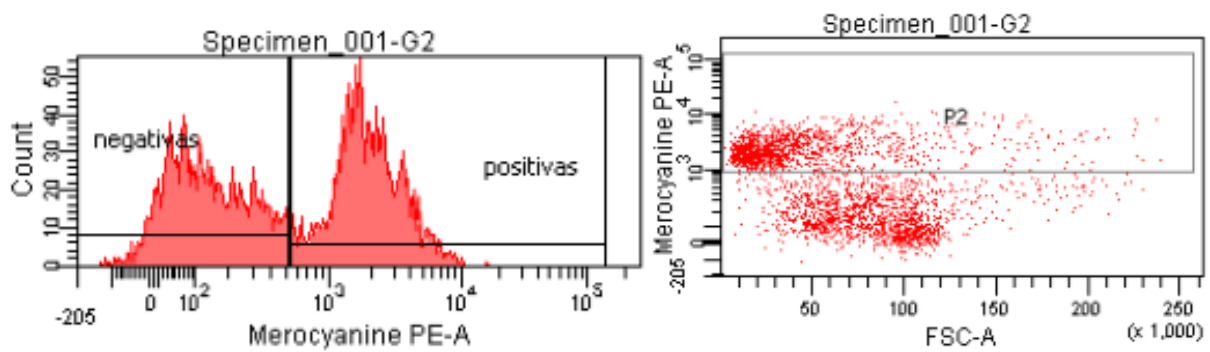
4.4 Citometría de flujo

- Grupo 1: Ursólico y pesticida (1 hora antes) (Gráfica 6 y 7)



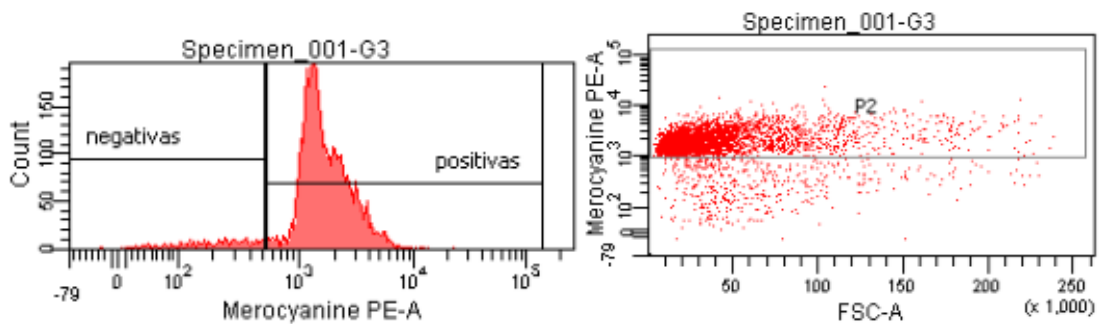
Gráfica 6 y 7. Representación resultados citometría de flujo G1

- Grupo 2: DHA y pesticida (1 hora antes) (Gráfica 8 y 9)



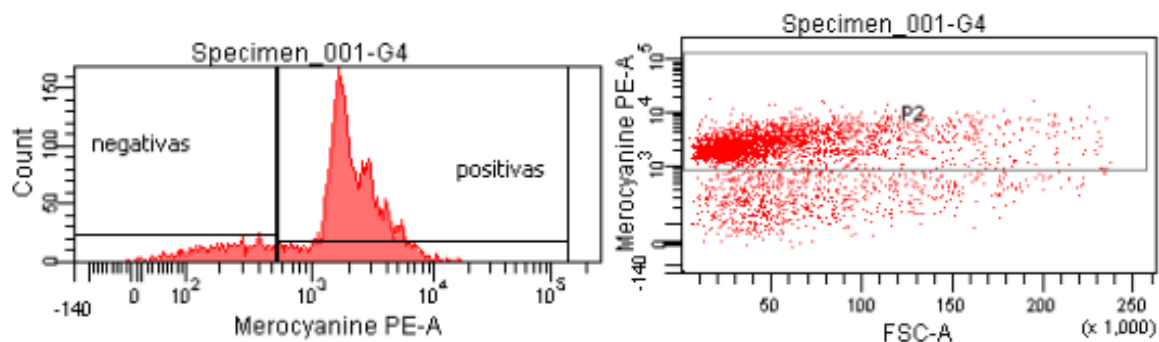
Gráfica 8 y 9. Representación resultados citometría de flujo G2

- Grupo 3: Pesticida (Gráfica 10 y 11)

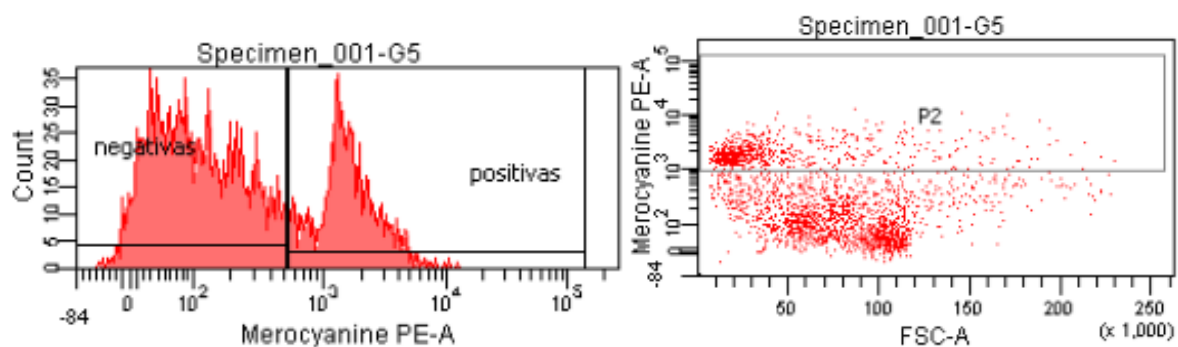


Gráfica 10 y 11. Representación resultados citometría de flujo G3

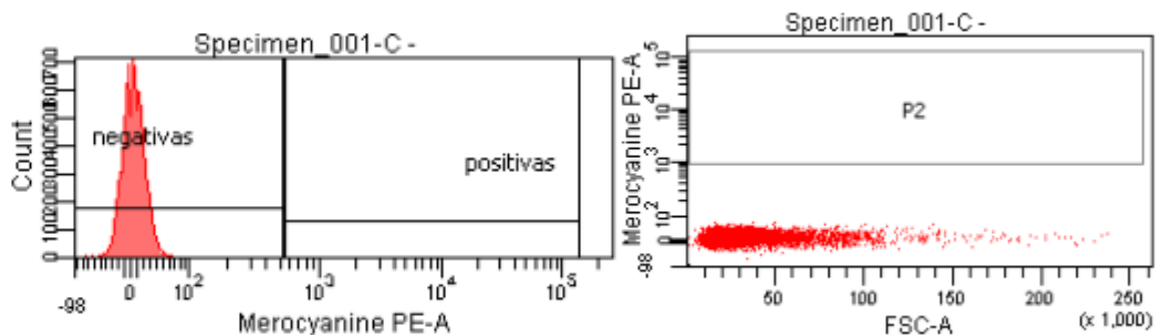
- Grupo 4: Ursólico (Gráfica 12 y 13)



- Grupo 5: DHA (Gráfica 14 y 15)



- Grupo 6: Control negativo (Gráfica 16 y 17)

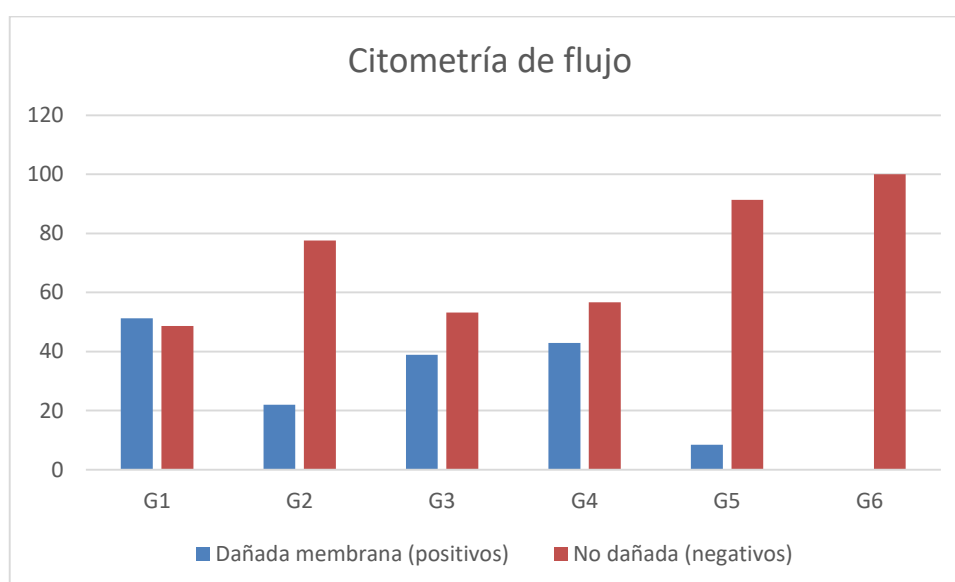


A continuación se aúnan en la siguiente tabla los porcentajes de cada grupo experimental (Tabla 11):

<i>n</i> = 10000	Membrana dañada (positivos)	No dañada (negativos)
G1	51,3	48,6
G2	22	77,6
G3	38,9	53,2
G4	42,9	56,7
G5	8,4	91,4
G6	0	100

Tabla 11. Porcentaje de espermatozoides dañados/ no dañados mediante técnica citometría de flujo
(t (6)=2,57; p=0,049)

Los valores son bastantes parecidos a los que obtuvimos con el kit de Oxisperm® para medir la producción de especies ROS. El grupo con DHA, ya sea con pesticida o no, posee mejores valores de espermatozoides no dañados que para el grupo con ursólico (con o sin pesticida). Los peores valores son para el G3 y los mejores el control negativo (G6) (única diferencia con respecto el apartado anterior del kit Oxisperm®). (Gráfica 18)



Gráfica 18. Representación resultados citometría de flujo en todos los grupos experimentales

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se experimentó de forma directa sobre esperma de cerdo *in vitro* si la cipermetrina (insecticida tipo II) causa alteraciones sobre el material empleado en cantidades de 50 μ L. Al mismo tiempo, se trató de comprobar si la aplicación de DHA y ácido ursólico como tratamientos, proporcionó alguna mejoría sobre el daño causado por el químico empleado. Durante el desarrollo del estudio, se usaron técnicas microscópicas, basadas en el análisis de la vitalidad, movilidad y morfología; citometría de flujo, gracias al empleo de compuestos como son Meriocianina 540 para analizar el daño de membrana y kits como Oxisperm[®], para comprobar la generación de ROS; y el de Halomax[®] de Halotech DNA, que evalúa el daño generado en el ADN, analizando la fragmentación de éste.

Durante el desarrollo del trabajo se puede ver la magnitud del efecto de la cipermetrina y el nivel de protección del DHA o ursólico, el cual fue eficaz en cierta medida, puesto que como se ha podido comprobar no en todas las pruebas llevadas a cabo su efecto protector ha sido igual de positivo, lo que se puede ver reflejado en:

- El desarrollo de las pruebas microscópicas hay que establecer una diferenciación entre los dos análisis realizados: uno a las 24 horas y otro a las 72 horas de incubación.
 - Vitalidad: tras 24 horas, tratamiento con DHA mejor resultados que con ácido ursólico. Se demuestra con los datos obtenidos que la cipermetrina es capaz de generar una serie de alteraciones, producir daños en la membrana, lo que compromete la viabilidad y vida del esperma. Con el paso del tiempo, tras el transcurso de 72 horas, efecto negativo del pesticida disminuye y aparecen valores más positivos con respecto a las 24 horas, a excepción del grupo control que disminuye valores positivos y los grupos con tratamiento los cuales tiene un resultado favorable muy parecido.
 - Morfología: tratamiento con ácido ursólico mejor que con DHA. Grupos con cipermetrina, defectos notables en la cabeza (cabeza aplanada) y la estructura del flagelo. Mejoría con el paso del tiempo en todos los grupos.

- Movilidad: inicialmente indicar que los tratamientos con DHA y ácido ursólico, como se ha indicado con anterioridad, produjeron en algunos casos aglutinaciones. Probablemente la justificación de estas aglutinaciones se debe a que las características/propiedades físicas de los tratamientos son que son poco solubles y se acumulaban allí los espermatozoides. Este factor probablemente perjudicó a la pérdida de los valores en general de la movilidad. Aun así, el grupo con ácido ursólico preserva mejor la movilidad que el DHA. Con el paso del tiempo, se ve perjudicada la movilidad de forma general en todos los grupos.
- Fragmentación del ADN a las 24 horas, el tratamiento con el ácido ursólico establece mejor calidad de cromatina que con el DHA. A las 72 horas, no hay daños aparentes con respecto a la fragmentación del ADN.
- Especies ROS / daño en la membrana (citometría de flujo), tanto para los valores de 24 horas como para los de 72 horas, DHA mejores resultados frente a la producción de especie ROS.

Todo lo anterior podría sugerir que dependiendo del parámetro que más afectado posea el individuo en particular, se aplicaría un tratamiento u otro. Sus efectos protectores sobre el espermatozoide son evidentes. De igual modo indicar, que se ha establecido según los resultados, que el efecto dañino ejercido por la cipermetrina ha sido notablemente reversible para la mayoría de los parámetros. Esto nos indica que o la cantidad administrada (50 µl) o el no haber administrado de forma continua la dosis a lo largo del transcurso del tiempo, no han establecido daños permanentes en el ADN del espermatozoide, aunque sí para la membrana plasmática del acrosoma.

6. CONCLUSIÓN

1. Las muestras control disminuyen sus niveles óptimos de evaluación espermática de forma natural y ajena al tóxico y a los tratamientos empleados sobre ellas, lo que se debe a su corta viabilidad una vez se empieza a trabajar con el material.

2. El DHA y ácido ursólico, empleados como tratamientos, no causan daños al espermatozoa, sino que ejercen sobre él una leve protección frente a la degradación de dicho material.

3. DHA mejora parámetros como la vitalidad y producción de especies ROS.

4. Ácido ursólico mejora parámetros como la morfología, movilidad, fragmentación del ADN.

5. La cipermetrina ocasiona una serie de alteraciones que afectan negativamente al espermatozoa, entre las que se pueden citar un aumento en el porcentaje de morfologías anómalas en este, un incremento en la producción ROS, fragmentación del ADN, daños de membrana, además de un descenso en la vitalidad espermática, que con el paso del tiempo mejoran estos parámetros.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa.

Mol. Hum. Reprod. 2010; 16:3-13

Álvarez, JG (2011) Utilidad del ácido docosahexaenoico en el tratamiento de la infertilidad masculina. *Andrología*, 9(4):138-144

Alvarez Sedó, C., Bilinski, M., Lorenzi, D., Uriondo, H., Noblía, F., Longobucco, V., Nodar, F. (). Efecto de la fragmentación del ADN espermático en el desarrollo embrionario: aspectos clínicos y biológicos. *Reproducción asistida por JBRA*, 21 (4), 343–350

Baehner, R. L., Boxer, L.A. & Davis, J. (1976) The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 48, 309-313

Dharambir Kashyap, Ajay Sharma, Hardeep S. Tuli, Sandeep Punia and Anil K. Sharma, "Ursolic Acid and Oleanolic Acid: Pentacyclic Terpenoids with Promising Anti-Inflammatory Activities", *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* (2016) 10: 21

Elbetieha, A., Da'as, S., Khamas, W. *et al.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. (2001) 41: 522

- Omid Mehrpour, Parissa Karrari, Nasim Zamani, Aristides M. Tsatsakis, Mohammad Abdollahi, Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: A review, *Toxicology Letters*, Volume 230, Issue 2, 2014, Pages 146-156
- E.M. Murphy, C. Stanton, C.O.' Brien, C. Murphy, S. Holden, R.P. Murphy, P. Varley, M.P. Boland, S. Fair, The effect of dietary supplementation of algae rich in docosahexaenoic acid on boar fertility, *Theriogenology*, Volume 90, 2017, Pages 78-87
- Biology of human reproduction. Edición: -. Autor: Piñón, Ramón. Editorial: Sausalito, Calif.: University Science Books, cop. 2002
- Safarinejad, Mohammad Reza *et al.*, Relationship of omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men, *Clinical Nutrition*, Volume 29, Issue 1, 100-105
- Dipty Singh, Sharad Bhagat, Paula Raijiwala, Vikas Dighe, Geeta Vanage, Perinatal exposure of pregnant rats to cypermethrin delays testicular descent, impairs fertility in F1 male progeny leading to developmental defects in F2 generation, *Chemosphere*, Volume 185, 2017, Pages 376-385
- Ran Yin, Tong Li, Jing Xin Tian, Pan Xi & Rui Hai Liu (2018) Ursolic acid, a potential anticancer compound for breast cancer therapy, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58:4, 568-574
- Farmacialiceo.com. (2019). *EUKID 30 CAPSULAS Farmacia Online Barata Liceo*. [online] Available at: <https://www.farmacialiceo.com/eukid-30-caps> [Accessed 25 May 2019]
- Es.wikipedia.org. (2019). *Ácido ursólico*. [online] Available at: https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_urs%C3%B3lico [Accessed 25 May 2019]
- Wwwuser.cnb.csic.es. (2019). *CITOMETRIA DE FLUJO*. [online] Available at: http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm [Accessed 6 Jun. 2019]
- Murcia, L. (2019). La fertilidad masculina murciana, en el punto de mira. Retrieved from <https://www.laopiniondemurcia.es/comunidad/2017/10/22/fertilidad-masculina-punto-mira/868957.html>
- Sperm biology: an evolutionary perspective. Edición: 1st ed. Autor: -. Editorial: Amsterdam; London: Elsevier Academic Press, 2009.

Environmental impacts on reproductive health and fertility. Edición: -. Autor: -. Editorial: Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2010

Stem cells in human reproduction: basic science and therapeutic potential. Edición: -. Autor: -. Editorial: Abingdon, U.K.: Informa Healthcare; Boca Raton: Taylor & Francis, cop. 2007