

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción

“Relación entre varios parámetros de la cromatina espermática mediante citometría de flujo”

TRABAJO FIN DE MÁSTER REALIZADO POR

ISABEL GUTIÉRREZ DÍAZ

TUTOR

FELIPE MARTÍNEZ PASTOR

JUNIO 2014

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 CONTEXTO	5
1.2 EL ESPERMATOZOIDE	10
1.3 GAMETOGÉNESIS	11
1.3.1 Fases de la espermatogénesis	13
1.4 LA CROMATINA ESPERMÁTICA	16
1.5 EL ORIGEN DEL DAÑO EN LA CROMATINA ESPERMÁTICA	17
1.5.1 Fragmentación en el ADN espermático	18
1.6 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	19
1.6.1 Alteraciones estructurales	19
1.6.2 Alteraciones numéricas	21
1.7 SEGREGACIÓN ANÓMALA DE LOS CROMOSOMAS	23
1.8 DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN ESPERMATOZOIDES	27
1.9 DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	28
1.10 EVALUACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN EL GANADO PORCINO	31
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS	34
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	34
3.2 REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO	37
3.2.1 Reactivos	37
3.2.2 Equipamiento	37
3.2.3 Soluciones stock y medios	37
3.3 PROTOCOLOS DESCRITOS EN LA BIBLIOGRAFÍA	42
3.4 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE EL EQUIPO INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM (ISAS®)	43
3.5 ANÁLISIS SCSA	45
3.6 ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	46
3.7 ANÁLISIS MICROSCÓPICO	48
3.8 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CITOMETRÍA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	49

4. RESULTADOS.....	51
4.1 Ajuste del citómetro de flujo.....	51
4.2 Experimento 1. Realización de los protocolos sin modificaciones.....	53
4.3 Experimento 2. Estabilidad de la tinción durante la conservación en frío.	60
4.4 Experimento 3. Eliminación de la post-fijación en etanol.....	67
4.5 Experimento 4. Comparación de los valores obtenidos en las muestras mediante el análisis dos fotodetectores y dos citómetros distintos.	69
4.6 Experimento 5. Realización del análisis de muestras humanas procedentes de clínicas de reproducción sospechosas de alteraciones cromosómicas (candidatas a evaluación por FISH).	71
5. DISCUSION.....	78
6. CONCLUSIONES	85
7. BIBLIOGRAFÍA	86
8. ANEXOS	95
AGRADECIMIENTOS.....	96

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTO

El comité Internacional de Seguimiento en Tecnología de Reproducción Asistida (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han definido la *infertilidad clínica* como enfermedad del sistema reproductivo caracterizada por la incapacidad de lograr embarazo clínico después de doce o más meses de relaciones regulares no protegida. El 10-15% de las parejas en edad reproductiva, en todo el mundo, se enfrentan a problemas de infertilidad. Se considera que entre un 30-40% de los casos es debido a causas femeninas, un 10-30% se deben a causas masculinas, y entre un 15-30% tiene un origen mixto, considerando un 5-10% a parejas con infertilidad de causa desconocida (WHO, 2010). Diferentes factores como la edad, obesidad, factores inmunológicos o psicológicos, enfermedades infecciosas, factores endocrinos, defectos anatómicos, tratamientos de quimioterapia y radioterapia o anomalías en los gametos pueden ser posibles causas de infertilidad (Bellver et al., 2010)

La infertilidad de causa masculina suele ir asociada a la presencia de parámetros seminales alterados y puede estar causada por diferentes factores (Brugo-Olmedo et al., 2003):

- Factores pre-testiculares

Afectan a la producción de hormonas que controlan la espermatogénesis (hipogonadismo hipogonadotrópico)

- Factores testiculares

Afectan al proceso de la espermatogénesis (varicocele, etc.).

- Factores espermáticos

Afectan a los propios espermatozoides.

- Factores post-testiculares

Afectan al transporte de los espermatozoides (eyaculación retrógrada, eyaculación prematura, ausencia de eyaculación, obstrucción o agenesia de los conductos seminales).

El desarrollo de las tecnologías de reproducción asistida (TRA) parece que ha supuesto una mejora al problema de la infertilidad masculina, dando la posibilidad a las parejas infértiles de poder tener hijos (Lewis, 2007). Para seleccionar la técnica de reproducción asistida más adecuada, la OMS en sus recomendaciones para el análisis de semen (2010), divide las variables biológicas a estudiar en básicas, opcionales y avanzadas, en base a la información e importancia que tienen en el análisis de semen (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de parámetros a incluir en un análisis de semen según la OMS en relación a la importancia de la información que suministran.

Básicos	<ul style="list-style-type: none"> • Examen macroscópico: licuefacción, aspecto, volumen, viscosidad, pH. • Concentración de espermatozoides y otras células • Vitalidad • Morfología espermática • Presencia de aglutinaciones • Detección de anticuerpos anti-espermatozoide unidos a la superficie espermática
Opcionales	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de teratozoospermia • Test hipoosmótico • Cultivos seminales • Análisis bioquímicos del líquido seminal • Análisis automático de la movilidad espermática • Test del ovocito de hámster • Test de funcionalidad espermática: <ul style="list-style-type: none"> Especies reactivas de oxígeno Test de unión a la zona pelúcida Evaluación de la reacción acrosómica
Avanzados	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis automático de la morfología espermática • Técnicas de recuperación de espermatozoides móviles: <ul style="list-style-type: none"> Swim-up y Gradientes de densidad

Tabla 2. Límites de referencia inferiores en los parámetros de semen según la OMS para el análisis de semen

Volumen	1,5 (1,4 – 1,7)
Movilidad total (progresivos + no progresivos, %)	40 (38- 42)
Movilidad progresiva	32 (31- 34)
Vitalidad (vivos, %)	58 (55 – 63)
Número total de espermatozoides (10^6 /eyaculado)	39 (33 – 46)
Concentración de espermatozoides (10^6 /ml)	15 (12 – 16)
Morfología espermática (normal, %)	3 (2 - 4)
Viscosidad	2
Licuefacción	Completa
Color	Nacarado
pH	7,2

A pesar de obtenerse valores normales en los parámetros en semen, hay una alta proporción de parejas sometidas a TRA que no consiguen embarazo (OMS, 2010).

Por lo tanto, se asume que existen parámetros adicionales que deben ser utilizados para evaluar la calidad del esperma.

Los casos de infertilidad asociado a anomalías cromosómicas son el resultado de un entorno intratesticular alterado, que afecta negativamente a los mecanismos de control de la segregación cromosómica durante la división celular. Las anomalías más frecuentes son aneuploidías, alteraciones estructurales del cromosoma Y, translocaciones recíprocas y Robertsonianas y cromosomas invertidos (Van Assche et al., 1996).

La tasa de producción de espermatozoides aneuploides es significativamente mayor en los pacientes con parámetros seminales anormales en comparación con pacientes normozoospermicos o pacientes infértiles con parámetros de semen normales. Diversos estudios han mostrado que los hombres infértiles podrían tener un alto riesgo de producir espermatozoides con aneuploidías, especialmente el grupo de pacientes que presenten oligoastenoteratozoospermia (OAT) (Bernardini et al., 2005; Tempest and Martin, 2009) .

Todos los cromosomas pueden sufrir potencialmente fenómenos de aneuploidías, aunque el riesgo es diferente en unos y otros. Los heterocromosomas tienen más índice de alteración que los autosomas. Existe una correlación negativa entre las aneuploidías y los principales parámetros del semen, lo que indica que un mayor daño testicular se asocia con una mayor probabilidad de cromosomas que presentan una mala segregación. Existen estudios que relacionan la morfología de los espermatozoides con una mayor incidencia de presentar anomalías cromosómicas (Burrello et al., 2004; Collodel and Moretti, 2006, 2008; Sun et al., 2006).

Con el paso de los años, se ha podido recuperar espermatozoides mediante su extracción del epidídimo. Diversos estudios han demostrado que los espermatozoides del epidídimo testicular presentan una mayor tasa de aneuploidías en comparación con la de los espermatozoides que se encuentran en el eyaculado (Xu et al., 2002). La presencia de aneuploidías en los espermatozoides parece producir un efecto negativo sobre los resultados de las TRA. A pesar de no afectar a la tasa de fertilización, una tasa de aneuploidía elevada se asocia con una mayor frecuencia de fracaso del embarazo (Bernardini et al., 2004; Carrell, 2008; Collodel and Moretti, 2008; Giorlandino et al., 1998; Al-Hassan et al., 2005; In't Veld et al., 1997; Pang et al., 1999; Petit et al., 2005; Rubio et al., 1999, 2001).

Existen pacientes con elevadas tasa de aneuploidías que consiguen un embarazo, aunque el riesgo de tener una descendencia aneuploide es elevado. Este riesgo potencial parece ser confirmado por varios estudios en los que se muestra la mayor incidencia de aneuploidías cromosómicas y estructurales *de novo* en niños concebidos mediante técnicas de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) en comparación con la población general (Bonduelle et al., 1998; In't Veld et al., 1995).

El desarrollo de la ICSI (Palermo et al., 1992) para el tratamiento de la infertilidad debido a un factor masculino severo ha mejorado las posibilidades de lograr un embarazo en muchas de las parejas infértiles (Van Steirteghem et al., 1996, 1993).

Sin embargo, el éxito de la fertilización por ICSI no asegura que el cigoto sea genéticamente viable. La perspectiva de la utilización de espermatozoides anormales para facilitar la fertilización no solo tiene implicaciones sobre la viabilidad de la futura concepción sino que también se puede correr el riesgo de transmitir anomalías genéticas asociadas con la infertilidad de los hombres que persiguen su descendencia mediante el uso de ICSI.

Aytoz et al. (1998), demostró que existe una tasa elevada de muerte embrionaria —asociada a la técnica de ICSI— en un grupo en que se utilizaban espermatozoides que presentaban graves alteraciones, en relación a otro grupo control con mayor calidad espermática. Incluso cuando una concepción por ICSI llega a término, existe un mayor riesgo de anomalías cromosómicas, enfermedad durante la infancia e infertilidad (Bonduelle et al., 2002; Van Steirteghem et al., 2002).

Por lo tanto, es importante utilizar un estudio complementario de las posibles aneuploidías en pacientes infértiles que presentan unos parámetros seminales anormales.

Además de esto, en los últimos años ha habido un creciente interés en desarrollar distintos métodos para determinar un número de factores, incluyendo la integridad de la membrana, la función mitocondrial, estado del acrosoma, etc. Los datos obtenidos por estas pruebas, como el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) (Evenson, 2013a), pueden correlacionarse con los obtenidos mediante el análisis de las aneuploidías consiguiendo una mayor información que pueda ayudar a solucionar los problemas de infertilidad masculina.

1.2 EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula compleja y altamente especializada encargada en transportar la información genética paterna hasta el ovocito. Para ello, cuenta con un potente flagelo que le permite desplazarse a través del medio acuoso y carece de orgánulos citoplasmáticos como ribosomas, retículo endoplásmico o complejo de Golgi, los cuales son innecesarios para su función. Además, el espermatozoide presenta mitocondrias colocadas estratégicamente en una pieza intermedia, proporcionar energía al flagelo más eficientemente, aunque se sabe que buena parte de la energía procede de la glucólisis. El espermatozoide está formado por dos regiones funcional y morfológicamente distintas, rodeadas por una misma membrana plasmática:

- La cabeza contiene el núcleo haploide extremadamente condensado, así como el acrosoma.
- La cola es la responsable de impulsar al espermatozoide hacia el óvulo y le ayuda a penetrar a través del cúmulo y de la zona pelúcida.

El ADN del núcleo es inactivo y se encuentra muy empaquetado, de modo que su volumen está muy reducido para su transporte.

La cabeza presenta un contorno regular y ligeramente oval. En la parte anterior de la cabeza, se encuentra una vesícula secretora especializada, denominada acrosoma. El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide a atravesar la envoltura externa del óvulo. Cuando un espermatozoide entra en contacto con un óvulo, el contenido del acrosoma se libera por exocitosis, mediante la denominada reacción acrosómica. El resto de la cabeza está ocupado por el núcleo haploide.

La cola de un espermatozoide es un largo flagelo cuyo axonema central sale de un corpúsculo basal situado inmediatamente detrás del núcleo. En la parte anterior de la cola del espermatozoide se encuentra la pieza intermedia, donde se organizan las mitocondrias. En algunos casos, la mitocondria colabora en reponer el pool de ATP, aunque suele ser una acción secundaria, teniendo mayor importancia en fenómenos concretos, como la capacitación (Amaral et al., 2013; Mukai and Travis, 2012; Peña et al., 2009; Ramalho-Santos et al., 2009; Sinha et al., 2013).

1.3 GAMETOGÉNESIS

La gametogénesis es el proceso mediante el cual se generan las células sexuales o gametos, con dotación cromosómica haploide. En la hembra se denomina ovogénesis y en el macho recibe el nombre de espermatogénesis. Ambos procesos se inician a partir de células germinales primordiales (gonocitos primordiales), que mediante sucesivas divisiones mitóticas dan lugar a las espermatogonias y ovogonias.

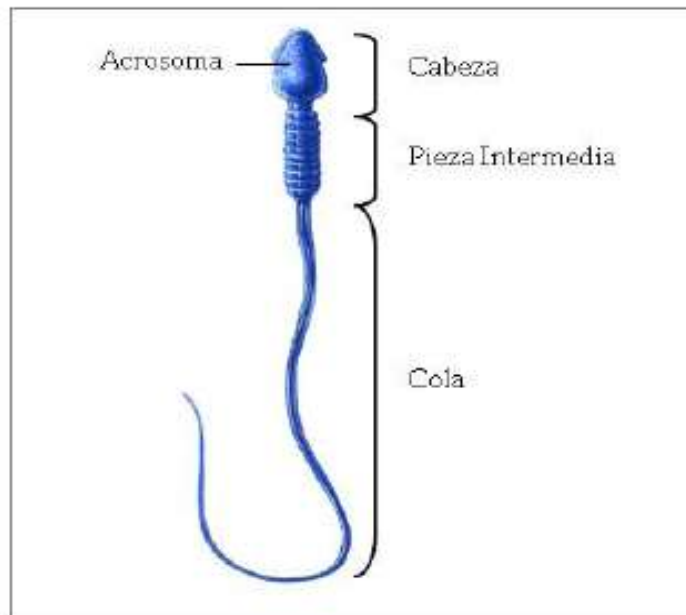


Figura 1. Estructura del espermatozoide compuesto por una cabeza, la pieza intermedia o cuello y una cola. El acrosoma se encuentra en el interior de la cabeza (Alberts et al. 1994).

Éstas, a su vez, se dividen por mitosis dando lugar a los denominados ovocitos y espermatoцитos primarios, que son las células que finalmente se dividirán mediante el proceso de meiosis. Después de la primera división meiótica, se forman los ovocitos y espermatoцитos secundarios que ya poseen una dotación cromosómica haploide.

La espermatogénesis o gametogénesis masculina tiene lugar en el interior de los túbulos seminíferos de los testículos humanos. Se inicia en la lámina basal de los túbulos seminíferos, a partir de células germinales diploides, con una dotación de 46 cromosomas en la especie humana. Las espermátidas que resultan de la segunda división meiótica tienen que pasar una última etapa de maduración conocida como espermiogénesis mediante la cual se diferencian a espermatozoides. Esta última etapa permite al espermatozoide adquirir la capacidad de fecundación e incluye la condensación del material nuclear, la formación de la cola del espermatozoide y el desarrollo del acrosoma y de su contenido. El complejo proceso de división y diferenciación culmina con la formación de los gametos masculinos haploides, con 23 cromosomas, y su liberación a la luz de los túbulos seminíferos (Cheng and Mruk, 2013).

El soporte estructural del epitelio germinal está constituido por las células de Sertoli. Son unas células grandes que se extienden desde la lámina basal hasta la luz del túbulo seminífero. Dan aporte nutritivo y de sujeción a los diferentes tipos celulares de la línea germinal. Las células de Sertoli adyacentes se unen estrechamente entre sí por complejos de unión, formando la barrera hematotesticular, que divide al túbulo seminífero en dos compartimentos:

- Compartimento basal (contiene las células germinales premeióticas)
- Compartimento luminal (contiene a las células germinales posmeióticas)

En la barrera hematotesticular se producen procesos variados y sincronizados que permiten la migración de las células germinales desde el compartimento basal hasta el luminal. En el tejido intersticial situado entre los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig, encargadas de la regulación de la espermatogénesis (Roosen-Runge, 1962). Además también se pueden encontrar macrófagos, linfocitos, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios.

La barrera hematotesticular aísla las células germinales del sistema inmunológico sanguíneo, generando un microambiente único para el desarrollo de la espermatogénesis (de Kretser et al., 1998).

El inicio del proceso de espermatogénesis empieza en la pubertad del individuo y es continua ininterrumpidamente durante toda la vida.

1.3.1 Fases de la espermatogénesis

La espermatogénesis se divide en tres fases: proliferativa, meiosis y espermiogénesis.

➤ *Fase proliferativa*

En el compartimento basal de los túbulos seminíferos encontramos a las células germinales inmadura o espermatogonias. En esta fase se produce la división continua por mitosis, generando un grupo de espermatogonias con capacidad para dividirse indefinidamente y, al alcanzar la madurez sexual, se produce otro grupo que deja de proliferar y se diferencia a espermatocitos primarios (I), que son células diploides, con 23 parejas de cromosomas homólogos con dos cromátidas hermanas cada uno.

➤ *Meiosis*

La división meiótica es el proceso de división celular por el cual la dotación cromosómica se reduce a la mitad. Cada núcleo diploide contiene dos versiones iguales de cada cromosoma (homólogos), una de las cuales proviene del padre y la otra de la madre.

En esta etapa, los espermatocitos primarios atraviesan la barrera hematotesticular y se localizan en el compartimento luminal del tubo seminífero donde suceden dos divisiones sucesivas (primera y segunda división meiótica), a partir de una sola replicación de ADN.

En un proceso de meiosis normal, el huso meiótico que se forma en metafase presenta dos polos, a partir de los cuales se origina una serie de microtúbulos que

capturan a los cromosomas homólogos (meiosis I) o a las cromátidas hermanas (meiosis II). Cada par de cromosomas homólogos apareados o de cromátidas hermanas presenta dos sitios de unión al huso meiótico, los cinetocoros, localizados en el centrómero.

Los dos cinetocoros de cada par son capturados por los microtúbulos de polos opuestos, de manera que en anafase, cada cromosoma homólogo o cromátida hermana migra a polos opuestos de la célula, y tras la telofase permanecerán en células hijas diferentes.

Meiosis I

La primera división meiótica es una división reduccional que consta de cuatro fases: profase I, metafase I, anafase I y telofase I

Antes de la profase I, los espermatoцитos primarios replican su ADN, duplicando el número de cromátidas hermanas por cromosoma. Posteriormente, entran en profase I. Los cromosomas homólogos se aparean y se produce la recombinación meiótica. Este proceso consta de cinco etapas bien caracterizadas (Handel and Schimenti, 2010) .

Meiosis II

Los espermatoцитos sufren una segunda división meiótica. Se trata de una división ecuatorial, similar a una mitosis con la diferencia de que las células son haploides, y que las dos cromátidas de cada cromosoma son diferentes debido al proceso de recombinación. Se divide también en cuatro fases:

- Profase II

Se produce la condensación de los cromosomas.

- Metafase II

Se forma el huso acromático y los cromosomas se disponen en la placa ecuatorial.

- Anafase II

En esta etapa se produce la separación de las dos cromátidas hacia polo opuestos.

- Telofase II

Se forman las envolturas nucleares alrededor de los cuatro núcleos haploides y desaparece el huso.

En esta división, las cohesinas existentes entre las cromátidas hermanas son eliminadas y cada espermatocito secundario se divide en dos espermatidas haploides, con 23 cromosomas con una cromátida hermana cada una.

El resultado de la meiosis es la formación de cuatro células haploides a partir de una célula diploide.

➤ Espermiogénesis

Las espermatidas sufren una diferenciación morfológica a espermatozoides maduros mediante el proceso de espermiogénesis. Se caracteriza por:

- Presentar una elevada condensación del núcleo asociada a modificaciones químicas en el ADN y en las proteínas nucleares, produciéndose una sustitución de histonas por protaminas.
- Formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi.
- Desarrollo del flagelo a partir de los centriolos.
- Eliminación de la mayor parte del citoplasma.

En la espermatogénesis, la citocinesis que acompaña a ambas divisiones meióticas es incompleta, de manera que las células hijas quedan en el interior de sincitios comunicadas por puentes citoplasmáticos. Al término de la espermiogénesis, los espermatozoides se liberan a la luz del túbulo seminífero y los sincitios se transforman en cuerpos residuales.

1.4 LA CROMATINA ESPERMÁTICA

La cromatina espermática está constituida por ADN y nucleoproteínas. Se encuentra inactivada ya que está altamente compactada (Ihara et al., 2014).

El proceso de compactación se produce durante la espermiogénesis, mediante la sustitución de histonas por proteínas de transición y, posteriormente, por protaminas. Las protaminas son proteínas capaces de unirse más firmemente al ADN que las histonas. La compactación se completa en el epidídimo, donde se establecen fuertes enlaces entre las protaminas mediante puentes disulfuro por la oxidación de los grupos sulfhidrilos (Lewin et al., 1999).

Este alto grado de condensación proporciona una mayor protección del ADN frente a agentes externos calor, productos tóxicos y otras agresiones con las que el espermatozoide se pueda enfrentar en el trayecto hacia el ovocito. Además, la compactación de la cromatina posibilita que la cabeza del espermatozoide presente dimensiones más reducidas, facilitándose el transporte espermático. Es importante que todos los procesos de maduración se desarrollen adecuadamente, ya que el espermatozoide maduro carece de la capacidad de reparación de los daños en el ADN (Dadoune, 2003).

Un espermiograma completo debería incluir pruebas de valoración del estado de la cromatina. Este tipo de evaluaciones tiene gran interés si tenemos en cuenta que la mayoría de métodos clásicos de valoración seminal poseen un alto componente subjetivo, con gran variabilidad intra e interobservador que se traduce en una baja repetitividad, así como una escasa correlación con la fertilidad.

La valoración del estado de la cromatina espermática aportaría ventajas médicas, en el caso de humano, y en otras especies ganaderas las ventajas serían económicas y de bienestar animal, al detectar individuos subfértiles o infértiles en los que no se observan alteraciones en el espermiograma básico. Debemos recordar que, en muchos casos, los espermatozoides mantendrían las funciones básicas intactas, como movilidad, acrosoma intacto, membrana plasmática íntegra, mitocondrias activas, etc. Esto permitiría la correcta fecundación del ovocito, pero los defectos en la cromatina provocarían alteraciones en el desarrollo embrionario (Silva and Gadella, 2006).

A la hora de establecer comparaciones entre la cromatina espermática humana con las de otras especies, hay que tener en cuenta que la cromatina humana es muy diferente a las de otros mamíferos. Es variable entre individuos e intra-individualmente y presenta un ratio total de protaminas en relación con el contenido total de ADN mucho menor que el observado en otras especies como toro, ratón o hámster. Además, hay que tener en cuenta que la cromatina espermática humana contiene dos tipos de protaminas (protaminas I y II), teniendo la protaminas II una deficiencia en residuos de cisteína, por lo que se forma una menor proporción de puentes disulfuro y, en conclusión, se produce una estructura potencialmente más inestable que la de otras especies que solo poseen protamina tipo I (Evenson, 2013b).

Todo ello se traduce en la necesidad de adaptar, de forma particular a cada especie, las técnicas de valoración como la interpretación de resultados y la determinación de los umbrales de fertilidad con los que se relaciona.

Entre las distintas fuentes de producción de anomalías en la cromatina espermática se encuentran las alteraciones durante la espermatogénesis (estrés fisiológico y ambiental, mutaciones de genes, anomalías cromosómicas, etc.)

1.5 EL ORIGEN DEL DAÑO EN LA CROMATINA ESPERMÁTICA

El ADN en el espermatozoide maduro es una estructura condensada, compacta e insoluble y dependiente de la presencia de zinc, que estabiliza la cromatina (Björndahl et al., 1986). En cualquier etapa del proceso de espermatogénesis, maduración o post-eyaculación se puede producir daño en el ADN del espermatozoide.

Se conoce que el daño es debido a un proceso multifactorial y no del todo delimitado, aunque algunos factores que pueden causar un daño irreversible en el ADN del gameto masculino son:

- Empaquetamiento anormal de la cromatina (Sakkas et al., 1999)
- Generación de radicales libres de oxígeno o estrés oxidativo (Zini et al., 2001)
- Deficiencias en la recombinación (Agarwal and Allamaneni, 2004)

- Apoptosis abortiva originada por fallo en la apoptosis de células germinales testiculares durante la espermatogénesis (Eaker et al., 2001).
- Causas externas que provocan o aumentan los efectos anteriores: determinadas condiciones ambientales (tabaquismo, elevada temperatura testicular, contaminación), patologías (criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infección del tracto genital, cáncer, episodios febriles, estrés) (Pacey, 2010; Robbins, 2003; Robbins et al., 2005; Vilorio et al., 2007).

La evaluación de la condensación o estabilidad de la cromatina espermática se puede llevar a cabo por distintos métodos: microscopio óptico, microscopio electrónico, o mediante tinciones fluorescentes específicas (microscopio de fluorescencia o mediante citometría de flujo) (Molina et al., 1995, 2001).

1.5.1 Fragmentación en el ADN espermático

La transmisión de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide hasta el ovocito es esencial para la consecución y desarrollo del embarazo. La fragmentación del ADN espermático podría conllevar alteraciones en la fecundación y el posterior desarrollo del futuro embrión. Por ello, en los últimos años se considera que una posible causa de esterilidad es el daño en la integridad del ADN espermático.

Las técnicas para el estudio de la fragmentación del ADN se pueden dividir en dos grupos:

Aquellas pruebas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos:

- Test de la estructura de la cromatina (SCSA o Sperm Chromatin Structure Assay)
- Hibridación in situ fluorescente (FISH)
- Sperm Chromatin Dispersion (SCD)
- Ensayo del cometa

Pruebas que marcan las roturas en la cadena de ADN porque incorporan moléculas marcadas con fluorocromos en el extremo de la rotura.

- Terminal Dntp Nick-End Labeling(TUNEL)
- In situ Nick Translation (ISNT)

1.6 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

1.6.1 Alteraciones estructurales

Las alteraciones estructurales afectan a la estructura y morfología sin producir variaciones en el número de cromosomas. Se producen por una fragmentación en la estructura de un cromosoma y la posterior reconstitución de la molécula en una disposición diferente. Las principales alteraciones estructurales son:

- Delecciones

Fragmentación en el cromosoma por un único punto o en varios.

- Duplicaciones

Repetición de un segmento cromosómico.

- Inversiones

Rotación del fragmento cromosómico con un giro de 180° y su posterior inserción en el mismo lugar. Puede ser paracéntrica o pericéntrica, según si el segmento fragmentado incluye o no al centrómero.

- Translocaciones

Las translocaciones se producen cuando los dos puntos de ruptura se da en cromosomas no homólogos, y los segmentos cromosómicos resultantes cambian de posición. Los cromosomas se denominan entonces derivados o híbridos. A su vez las translocaciones pueden ser recíprocas cuando se intercambian segmentos de dos cromosomas, o Robertsonianas o fusiones céntricas cuando se fusionan dos cromosomas acrocéntricos. Este tipo de alteraciones son las más frecuentes en humanos con una incidencia de 0,17%, correspondiendo 0,092% a las translocaciones recíprocas y un 0,086% a las Robertsonianas.

Las *translocaciones Robertsonianas* se denominan así porque fueron identificadas por primera vez por Robertson en 1916. Resultan de la fusión de dos cromosomas acrocéntricos no homólogos a nivel del centrómero, formando un cromosoma meta o submetacéntrico.

Los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos se suelen perder en las siguientes divisiones celulares, pero en humanos se ha observado como son susceptibles de aparearse con el par cromosómico sexual produciendo casos de esterilidad en hombres al interferir en la inactivación del cromosoma X. El cariotipo de los animales portadores de estas alteraciones tiene un cromosoma menos. El fenotipo del animal portador suele ser normal, sin embargo el problema se produce durante la meiosis. Para que se pueda producir la recombinación se debe formar una configuración en trivalente entre el cromosoma translocado y los homólogos normales. Como consecuencia en la segregación meiótica (tipo 2:1) se pueden generar distintos tipos de gametos:

- Si el trivalente migra hacia un polo y los cromosomas normales hacia el polo opuesto (segregación alterna), se forman gametos equilibrados y normales, respectivamente.
- Si un cromosoma normal migra con el trivalente a un polo y el otro cromosoma normal al polo opuesto (segregación adyacente) se forman gametos desequilibrados, disómicos para un cromosoma y nulisómicos para el otro, por lo tanto en casos estos son letales.

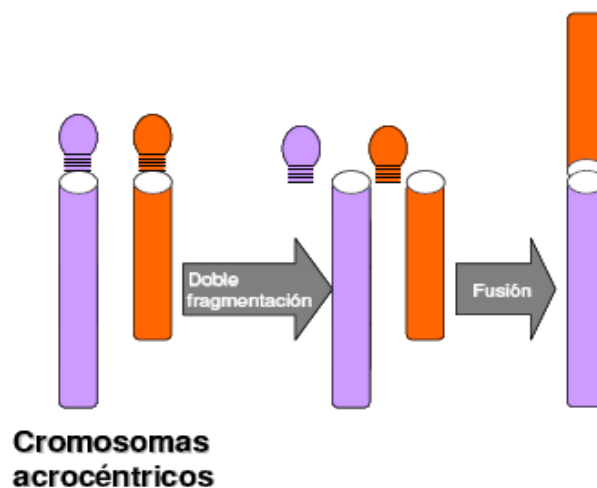


Figura 3. Formación de una translocación Robertsoniana

Las *translocaciones recíprocas* implican un intercambio de segmentos cromosómicos entre dos cromosomas. Es una anomalía equilibrada ya que no existe pérdida de material genético. No suelen presentar repercusiones a nivel fenotípico, pero sin embargo su presencia se asocia a un riesgo elevado de producción de gametos desequilibrados y la aparición de problemas reproductivos y en la descendencia.

1.6.2 Alteraciones numéricas

Las alteraciones de tipo numérico resultan de la pérdida o ganancia de cromosomas, produciéndose un desequilibrio cromosómico en el cariotipo. Las causas de este tipo de variaciones pueden ser errores que se producen durante la meiosis en la gametogénesis, o errores durante las primeras divisiones mitóticas del embrión.

En el primer caso, el resultado son gametos que poseen cromosomas en exceso o defecto que después de la fecundación darán embriones con el cariotipo desequilibrado. En el segundo caso, los individuos presentarán mosaicismo celular, es decir, varias líneas celulares con diferente número de cromosomas.

Aneuploidías

Las aneuploidías son las anormalidades cromosómicas más frecuentes en los espermatozoides humanos. La mayor parte de estas anormalidades resultan de errores de meiosis durante el proceso de gametogénesis en los padres. En varones estos errores pueden llevar a la producción de espermatozoides con anormalidades numéricas de los cromosomas y por esta razón, existen autores que recomiendan la hibridación in situ fluorescente (FISH) para un mejor diagnóstico clínico (Sarrate and Anton, 2009).

Este tipo de alteraciones afectan únicamente a un par cromosómicos y son producidas cuando los dos cromosomas homólogos migran al mismo polo (no disyunción). Si la no disyunción se produce en la primera o en la segunda división meiótica en la gametogénesis, se producen cuatro gametos desequilibrados, o dos desequilibrados y dos equilibrados. Los cigotos formados después de la fecundación serán trisómicos o monosómicos para ese cromosoma. Cuando la no disyunción de un par cromosómico se da en los cromosomas sexuales, se producen desequilibrios menos perjudiciales, aunque siempre debe existir un cromosoma X para que el embrión sea viable.

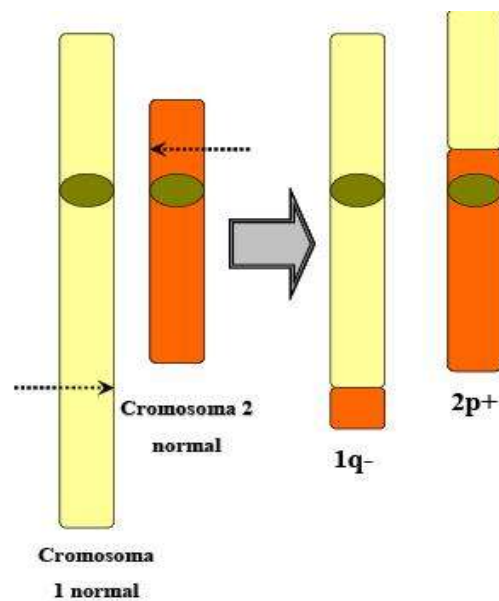


Figura 4. Representación esquemática de una translocación recíproca. Las líneas marcan el punto de intercambio

Euploidías

Se trata de alteraciones que resultan de una variación del complemento cromosómico normal diploide. En este caso se denomina haploidía si el número de cromosomas es n , o poliploidías si la dotación es $3n$ o mayores (triploidía, tetraploidía). Estas alteraciones suelen producirse durante la fecundación. Las más frecuentes en humanos son las triploidías, aunque habitualmente degeneran en abortos espontáneos. Los mecanismos para la formación de poliploides son:

- **Diginía**

Se produce cuando no se realiza la expulsión del segundo corpúsculo polar después de la fecundación.

- **Diandría**

Se origina cuando se produce la fecundación de un ovocito por dos espermatozoides. La diandría es cuatro veces más frecuente que la diginía.

Las tetraploidías son las causantes del 6% de los abortos en humanos, y suelen causar muerte en etapas embrionarias muy tempranas.

1.7 SEGREGACIÓN ANÓMALA DE LOS CROMOSOMAS

En el proceso de meiosis existen puntos de control (*checkpoints*) que regulan las distintas etapas de la meiosis y eliminan parcialmente las células germinales anómalas para asegurar la formación de manera correcta de los espermatozoides con la dotación cromosómica que les corresponde. Por ello, la espermatogénesis puede detenerse en cualquier estadio madurativo de la línea germinal afectando a todas las líneas celulares germinales provocando un bloqueo completo, o solo produciéndose un bloqueo parcial.

La segregación anómala puede suceder por mecanismos diferentes:

- Mecanismos de no disyunción meiótica

El fallo en la correcta disposición de los quiasmas o puntos de recombinación entre cromosomas homólogos en anafase I daría lugar a una no disyunción de los cromosomas homólogos en la meiosis I, y ambos cromosomas migrarían juntos al mismo polo del huso meiótico. Así mismo, una resolución prematura de quiasma en meiosis I, un número reducido o la ausencia total de quiasmas entre un par de cromosomas homólogos pueden producir una no disyunción aquirasmática, de manera que ambos cromosomas, sin haber recombinado, migran de forma independiente en la meiosis I pero lo hacen hacia un mismo polo del huso meiótico en lugar de hacia polos opuestos.

Los errores en la meiosis II se consideran mayoritariamente debidos a fallos en la separación o no disyunción de las cromátidas hermanas (Hassold and Hunt, 2001a).

Algunos autores opinan que, en algunos cromosomas, el origen de los errores en la meiosis II deriva de errores en la meiosis I, con la no segregación del par de cromosomas homólogos, seguido de la migración durante la meiosis II, de las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma al mismo polo, dando lugar a disomías uniparentales (Lamb et al., 1996).

En los últimos años, mediante técnicas moleculares, se ha correlacionado la aneuploidía con alteraciones en la recombinación genética (Hassold et al., 2000a). En algunos modelos animales, como el llevado a cabo en *Drosophila*, se han encontrado mutaciones que disminuyen o anulan la recombinación, provocando bloqueos meióticos, errores de segregación o elevadas tasa de no disyunciones (Hawley, 2003; Shi et al., 2002). El estudio de los mapas de recombinación de varios cromosomas humanos (15, 16, 18, 21, X e Y) conjuntamente con estudios de herencia de polimorfismos de ADN en fetos trisómicos (Hassold et al., 2001) indican que una disminución en el número de quiasmas como una distribución anormal de los mismos (posiciones subóptimas, muy distales o pericentroméricas) durante la meiosis I, aumentan el riesgo de no disyunción (Hassold et al., 2000b; Sun et al., 2004).

Así mismo, pueden existir otros factores causantes de no disyunción como son la separación prematura de las cromátidas hermanas por la pérdida de cohesión entre ellas, adhesión de los cromosomas homólogos a microtúbulos de diferente polaridad (Petronczki et al., 2003), factores ambientales externos (Guttenbach et al., 1997) o un ambiente testicular alterado (Miller and Therman, 2001).

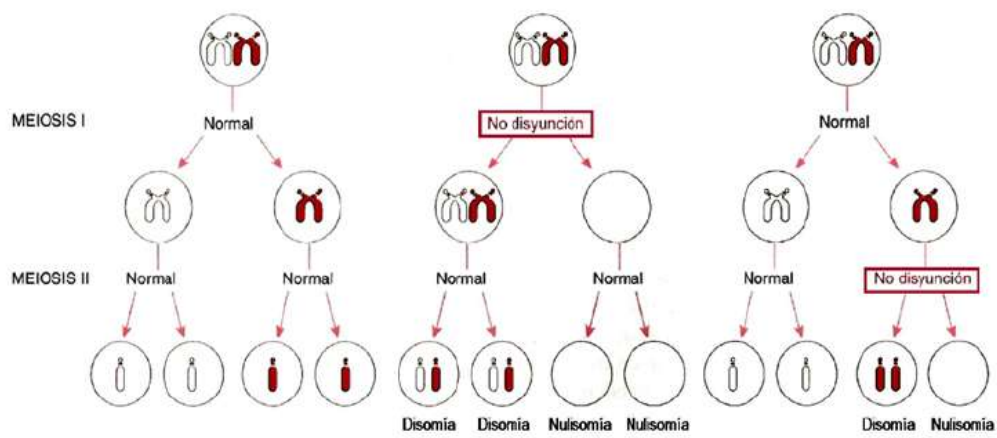


Figura 5. Formación de gametos aneuploides por fenómenos de no disyunción (Nussbaum et al. 2005)

- Separación precoz de cromátidas hermanas

La separación prematura de las cromátidas hermanas en la meiosis I puede dar lugar a la segregación de un cromosoma completo y una cromátida hermana de su homólogo a un mismo polo del huso meiótico (Hassold and Hunt, 2001b; Hassold et al., 2007) .

Cuando tienen lugar errores durante la meiosis tanto por mecanismos de no disyunción como por la separación precoz de cromátidas hermanas, podría producirse una unión de los cinetócoros de los cromosomas homólogos (meiosis I) o de las cromátidas hermanas (meiosis II) con los microtúbulos de un mismo polo del huso meiótico (unión monopolar) (Nicklas, 1997), lo que haría que migrasen juntos al mismo polo en lugar de a polos opuestos. En caso de que ocurriese esto, al final de la meiosis se obtendrían dos gametos aneuploides, uno con doble dotación cromosómica o disómico procedente de la células que adquiere el polo del huso al que se han unido los dos cromosomas o cromátidas, y otro sin ninguna dotación cromosómica o nulisómico procedente de la célula que adquiere el polo del huso que no ha sufrido la correspondiente unión cromosómica.

Las anomalías sinápticas con disminución del apareamiento y separación precoz de cromosomas homólogos pueden alterar la sincronía y alineación de los cromosomas en la placa metafásica del huso meiótico, dando lugar a bivalente o univalentes erráticos en metafase I, afectando al punto de control de la anafase I. Si no ocurre el bloqueo meiótico, el espermatocito primario puede progresar la meiosis sin dividirse y dar lugar a espermatocitos secundarios diploides, que formarán finalmente dos gametos diploides tras la segunda división meiótica (Barri et al., 2005; Egozcue et al., 2000) .

Un estudio de polimorfismos de microsatélites en sesenta y un embriones triploides realizado por Zaragoza y su grupo et al. (2000) determinó que los triploides mayoritariamente se originan por el fenómeno de dispermia (Zaragoza et al., 2000).

La dispermia consiste en la fecundación de un ovocito por dos espermatozoides. Esto ocurre en el 60,6% de los casos. El resto se origina por fecundación de una gameto diploide formación durante la meiosis (36%), como consecuencia de una fusión de ovocitos (3,2%), o debido a errores mitóticos postmeióticos (1,6 %).

1.8 DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN ESPERMATOZOIDES

Diferenciar entre una anomalía cromosómica equilibrada y una desequilibrada resulta muchas veces imposible si tan sólo se dispone de las técnicas de citogenética convencional. La aparición de nuevas técnicas de citogenética molecular, que combinan técnicas de genética moléculas con las de citogenética convencional, ha permitido un gran avance en la detección e identificación de muchas de estas anomalías.

Hibridación in situ fluorescente convencional (FISH)

La hibridación fluorescente in situ (FISH) es una técnica indirecta que ha demostrado ser un buen método para la determinación del contenido cromosómico tanto del gameto masculino como femenino. La FISH es una técnica simple que permite analizar un gran número de células a la vez.

No obstante, esta técnica presenta limitaciones. Es un procedimiento costoso y limitado por el número de sondas disponibles. Solo da información de determinados cromosomas y la detección de aberraciones estructurales es también limitada. Además, existe una gran variabilidad intra-individual en la frecuencia de aneuploidías espermáticas (Tempest et al., 2009).

Su realización e interpretación no está exenta de determinada variabilidad intra observador y entre los distintos laboratorios. Por todo esto, la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) recomienda participar en los programas de control de calidad externos para FISH al menos anualmente (Thornhill et al., 2005).

Se recomienda por lo tanto, dar consejo genético a las parejas con factor masculino que podrían tener riesgo de tener una descendencia aneuploide, antes de proceder con la ICSI, o, de llevarla a cabo, acompañar el procedimiento con un diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

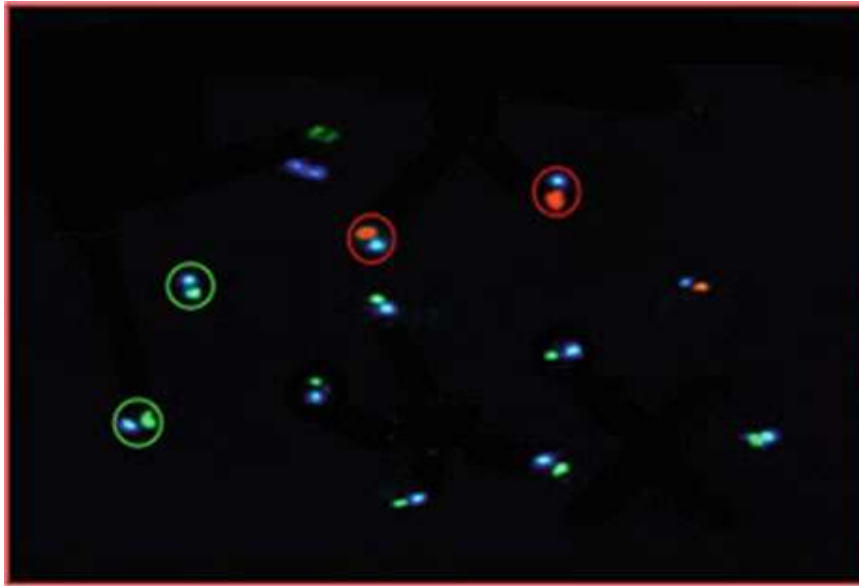


Figura 6. Análisis de FISH utilizando distintas sondas de detección de los centrómeros para los cromosomas 18 (azul), X (verde) y Y (rojo). Están marcados con un círculo verde los núcleos aneuploides de los cromosomas 18 y X, y con círculos rojos los de los cromosomas 18 y Y. (Piomboni et al. 2014)

1.9 DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una de las metodologías que ha supuesto un mayor avance en el estudio del semen. Ha sido utilizada para analizar la estructura de la cromatina espermática, detectar y separar los espermatozoides con cromosomas X o con cromosomas Y, valorar la viabilidad espermática y la actividad mitocondrial. Entre las numerosas ventajas que ofrece su uso para la valoración de las características espermáticas conviene resaltar el ahorro de tiempo con respecto a otros métodos tradicionales, el gran número de células analizadas en cada estudio y su buena repetibilidad.

El fundamento de un citómetro de flujo consiste en crear una corriente de flujo laminar conteniendo la muestra, de manera que las células marcadas con un fluorocromo pasan una a una por delante de un rayo de láser cuyo haz incide sobre

ellas, excitando los fluorocromos con una determinada longitud de onda. Un fotomultiplicador capta la luz dispersada que no ha sufrido desviación (FSC – forward scattered light) y su señal informa sobre el tamaño de la partícula. Otra fotomultiplicador recoge la luz que ha sufrido una desviación de 90° (SSC – side scattered light) e informa sobre la complejidad de la célula (estructura interna). Esta información permite seleccionar grupos de células de la población en función del tamaño y la complejidad, y de este modo, eliminar de la población aquellas partículas que no se correspondan con las células a estudiar. La luz captada por las células excita los fluorocromos, que emiten luz en un rango de longitud de onda determinado. Esta radiación, de una longitud de onda específica según el tipo de fluorocromo, pasa a través de una serie de filtros, en función de su longitud de onda, y es captada por una serie de fotomultiplicadores permitiendo cuantificar el marcaje del fluorocromo en la población celular.

El análisis del espermatozoide mediante la citometría de flujo es un método fiable para la evaluación de la condensación de la cromatina de los espermatozoides (Evenson and Melamed, 1983) (Golan et al., 1997) y las aneuploidías (Levek-Motola et al., 2005) . Estudios recientes han asociado la condensación de la cromatina de los espermatozoides y la ploidía con morfología y motilidad espermática, así como con la inseminación intrauterina (Lazaros et al., 2011a) y la fecundación in vitro (Lazaros et al., 2011b).

El análisis de las aneuploidías por citometría de flujo es una técnica poderosa para detectar la presencia de células haploides sobre todo en biopsias testiculares, y se ha utilizado para evaluar la función testicular en varios estudios (Pfitzer et al., 1982) (Chan et al., 1984). El uso de la citometría de flujo para la detección de la cantidad de ADN se describe en numerosos trabajos (Figura 7). En algunos de ellos se diferencian cuatro grupos de poblaciones atendiendo a la cantidad de ADN que contienen, con ello se diferencian entre células haploides altamente condensadas (espermatozoides), células haploides menos condensadas (espermátidas), células diploides (células somáticas, espermatogonias, espermatoцитos primarios y secundarios en primera fase de división meiótica) y células tetraploides (espermatoцитos primarios y secundarios en segunda fase de división meiótica) (Bonanni et al., 1997).

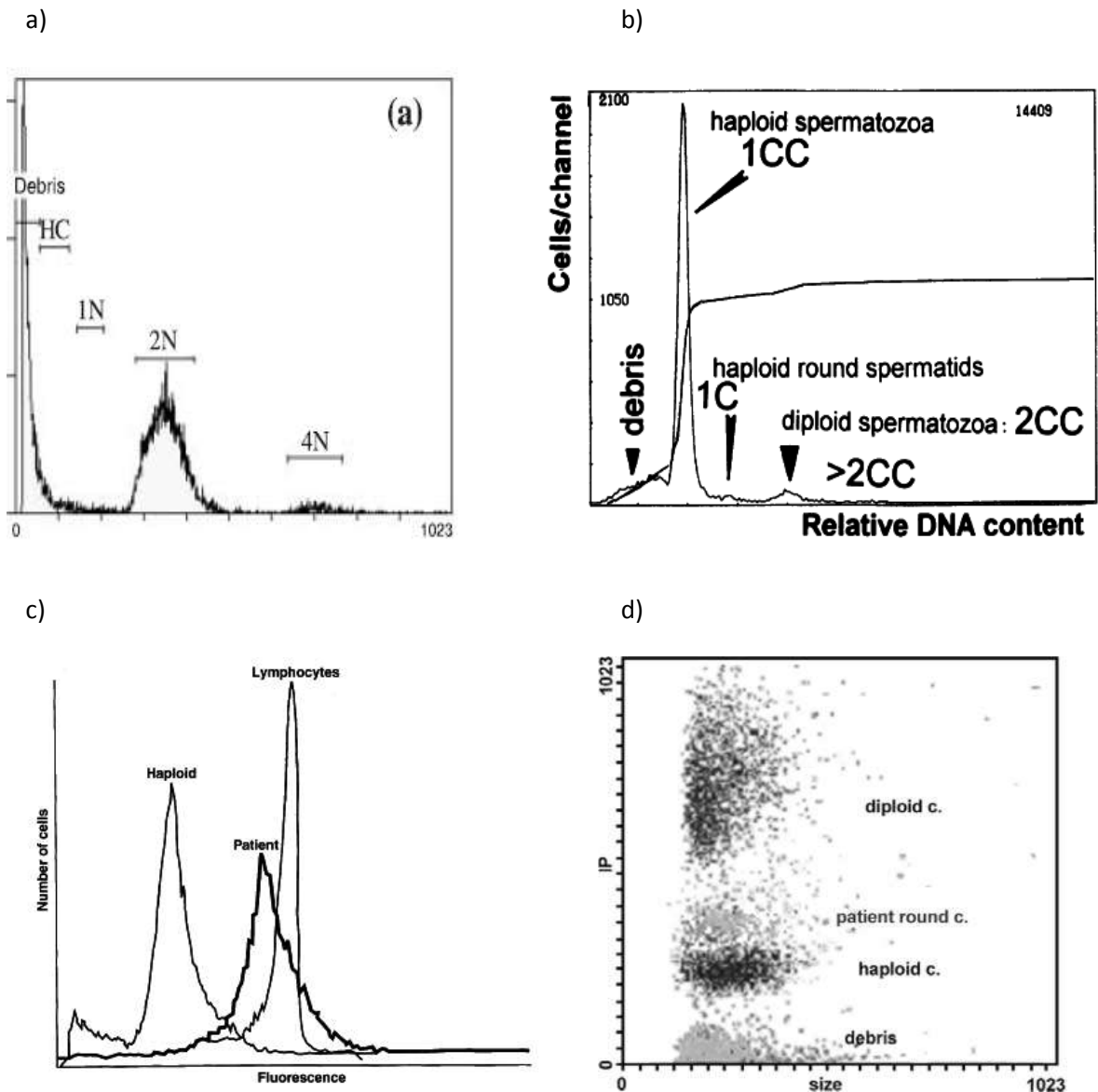


Figura 7. Distintos histogramas representativos de las poblaciones existentes en la espermatogénesis. La figura a) se subdivide en cuatro regiones, considerando HC como células altamente condensadas, 1N células haploides no condensadas (células redondas), 2N diploides y 4N tetraploides (Yeung et al.2007). La figura b) se asemeja a nuestra clasificación, a pesar de disponer de cuatro regiones, 1CC representa los espermatozoides haploides maduros, 1C son las espermátidas redondas, 2CC son los diploides, y >2CC son tetraploides (Kacker-Klom et al. 1999). La figura c) es un ejemplo de un histograma en el que se representa el pico diploide con la población de linfocitos. Como se puede observar el paciente, presenta una cercanía al pico diploide. (Weissenberg et al.1988). La figura d) representa los niveles de fluorescencia en función del tamaño de las células. Haploid c son los espermatozoides haploides maduros, diploid c correspondería al pico de los diploides representado por una población de linfocitos. En el medio se encuentra la población de células que presenta al paciente, que corresponderían con células inmaduras, espermátidas redondas (Koscinski et al. 2005).

Existen estudios en los cuales se complementa el análisis del contenido ADN y una tinción específica para los filamentos de vimentina de muestras testiculares mediante citometría de flujo para evaluar los trastornos espermatogénicos (Hittmair et al., 1994). Así como su uso como un método predictivo en pacientes que han sufrido un cáncer (Coskun et al., 2002) (Giwercman et al., 1988).

En nuestro estudio, se utilizó la citometría de flujo como método no invasivo, por ser un medio eficaz para la detección de defectos en la espermatogénesis humana, sobre todo la detección de aneuploidías. Se utilizó IP para teñir el ADN de doble cadena de las células presentes en las muestras seminales, con el propósito de identificar la cantidad de ADN de distintas poblaciones espermáticas y determinar si había alteraciones cromosómicas. En estas células sometidas a citometría de flujo se realizó una estimación cuantitativa de la cantidad de ADN y fluorescencia que contenían, clasificándolas como células hipohaploides, células haploides maduras, una pequeña región con células haploides inmaduras, hiperhaploides, diploides y tetraploides. La comparación de estos resultados con los obtenidos por la técnica de SCSA puede servir para dar un diagnóstico más conciso y asegurar la técnica de reproducción asistida a utilizar.

1.10 EVALUACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN EL GANADO PORCINO

En los animales domésticos, el impacto de las alteraciones en el ADN y anomalías cromosómicas sobre la eficiencia reproductiva de los animales portadores ha sido ampliamente estudiado (Evenson, 1999; Saacke, 2008). En el cerdo (*Sus scrofa domestica*), las alteraciones cromosómicas que se producen con mayor frecuencia son las translocaciones recíprocas (Inglot et al., 2012). También existen algunos casos descritos de translocaciones Robertsonianas e inversiones identificadas (Ducos et al., 2000; Pinton et al., 2004a). En casi todas las razas porcinas de interés comercial se ha identificado alguna translocación recíproca: Landrace, Large White, Duroc, Pietrain, Yorkshire, etc., y parece que no existen indicios de que las translocaciones puedan afectar más a unas razas que a otras.

El objetivo principal de control de estos animales, se ha basado en la enorme trascendencia que los verracos de centros de inseminación tienen a nivel reproductivo debido a la inseminación de un gran número de hembras con dosis seminales de un mismo verraco. Además, en la actualidad también se está controlando los resultados reproductivos de las hembras, con el fin de poder detectar y limitar las posibles portadores de alteraciones cromosómicas.

Las consecuencias económicas pueden llegar a ser importantes si el animal portador produce un elevado número de camadas, como es el caso de los reproductores utilizados en la inseminación artificial.

2. OBJETIVOS

La validez clínica de una nueva prueba debe ser evaluada antes de su incorporación a la práctica diaria, con el fin de determinar si la introducción de esta nueva prueba es fiable, aportando más información o a cambiando la actitud terapéutica.

El objetivo principal de este trabajo es la puesta a punto de un método para evaluar mediante citometría de flujo las poblaciones de células de una muestra según su nivel de ploidía ($n-i$, n , $n+i$, $2n$, $4n\dots$), para así determinar el impacto de posibles alteraciones en el número n por exceso o defecto de algún cromosoma (aneuploidías).

Para ello, definimos los siguientes objetivos específicos:

1. Revisar la bibliografía para determinar los procedimientos descritos con este fin y seleccionar aquellos más establecidos o con mayor nivel de innovación y, potencialmente, fiabilidad.
2. Reproducir en nuestro laboratorio estos procedimientos seleccionados, tanto en semen de humano como de cerdo.
3. Realizar las modificaciones que consideremos pertinentes para optimizar estos procedimientos, evaluando su impacto en los resultados: modificación u omisión de determinados pasos, utilización de distintos citómetros, etc.
4. Evaluar muestras procedentes de clínicas y que han sido seleccionadas como candidatas para realizar FISH por ser sospechosas de contener anomalías cromosómicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este experimento se utilizaron muestras de semen procedentes de humano y adicionalmente, se utilizaron muestras de cerdo. En principio se pusieron a punto los protocolos descritos por sus autores, tal y como aparecen en la bibliografía y posteriormente, se probaron varias modificaciones intentando optimizar los procesos.

a) Experimentos

En todos los casos se realizó un análisis de la fragmentación espermática mediante la técnica del SCSA, de manera que se contó con esa información para contrastarla frente a los resultados de los distintos experimentos.

Experimento 1. Realización de los protocolos sin modificaciones.

En este experimento se pusieron a punto las técnicas. Se realizaron ambos protocolos con muestras estándar de cerdo y humano, para comprobar si los resultados eran similares y cuál sería más adecuado.

Protocolo de Lazaros et al. (2011)

Se descongelaron las muestras en un baño de agua a una temperatura de 37 °C y se determinó la concentración. A continuación se añadió un volumen de PBS-BSA a cada muestra, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Se incubaron las muestras en etanol 70% durante 2 horas y a una temperatura de -20 °C. Después, se realizó otra centrifugación y finalmente, se añadió la solución de tinción y se analizaron las muestras con el citómetro de flujo.

Protocolo de Antonucci et al. (2013)

Se descongelaron las muestras en un baño de agua a 37 °C y se determinó la concentración. A continuación, se añadió un volumen de PBS-BSA, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió la muestra en la solución fijadora (PBS-PFA), durante 10 min y se lavó la muestra con PBS-BSA. Posteriormente, se añadió una solución de descondensación de la cromatina (ajustada a cada especie). Las muestras se incubaron durante 30 minutos, y se lavó con PBS-BSA. A la muestra resultante se le añadió etanol 70% y se dejó incubando durante 2 horas a -20°C. Finalmente, se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se añadió la solución de tinción para poder analizar las muestras en el citómetro de flujo.

Experimento 2. Realización de medidas en el citómetro a diferentes tiempos post-tinción

En este experimento evaluamos la estabilidad de la tinción a distintos tiempos, para comprobar si sería posible obtener resultados viables aunque no se analizaran las muestras inmediatamente tras realizar la tinción.

Se realizó el experimento siguiendo los protocolos mencionados en el experimento 1, realizando medidas al terminar el protocolo (tiempo 0), a dos horas (tiempo 2) y a cuatro horas (tiempo 4). Las muestras se almacenaron a 4 °C y oscuridad tras la primera medida (tiempo 0).

En una segunda parte se probaron tiempos más extremos, analizando algunas muestras 24 y 48 horas tras la realización del protocolo.

Experimento 3. Realización de los protocolos eliminando el paso de incubación en etanol.

En este experimento eliminamos del paso de incubación de dos horas en etanol 70% a -20 °C en ambos protocolos. Este protocolo se realizó con el fin de optimizar la técnica, ya que la fijación en etanol alarga el protocolo, incrementa la pérdida de células en el sobrenadante y causó la aglutinación de los espermatozoides de cerdo, ocasionando artefactos en la medida.

Además, sospechamos que este paso de fijación no afecta a la tinción o a la estabilidad de las muestras a corto plazo. Se utilizaron muestras estándar de humano y de cerdo.

Experimento 4. Comparación de los valores obtenidos en las muestras mediante el análisis con distintos citómetros y con diferentes fotodetectores

En este experimento realizamos la comparación de los distintos fotodetectores con los que analizamos las muestras, diferenciando las distintas técnicas utilizadas. El fotodetector FL-2, recoge la emisión fluorescente naranja, mientras que el fotodetector FL-3 recoge la roja. Además comprobamos las mismas muestras utilizando dos modelos de citómetros distintos, FACSCalibur (Becton Dickinson) y CyAn ADP (Beckman Coulter).

Los resultados del resto de los experimentos se corresponden con lecturas en el citómetro FACSCalibur utilizando el fotodetector FL-3.

Experimento 5. Realización del análisis de muestras humanas procedentes de clínicas de reproducción sospechosas de alteraciones cromosómicas (candidatas a evaluación por FISH).

Este experimento sirve para validar la técnica, ya que se puede comparar con los resultados de una prueba estándar para la detección de alteraciones cromosómicas, como el FISH. En este experimento utilizamos solo el protocolo según Antonucci et al. (2012) y sin el paso de incubación en etanol. Analizamos un total de 27 muestras que procedían de las clínicas de reproducción asistida CREA Medicina de la Reproducción (Valencia), GINEFIV (Madrid) y del Hospital de Nuestra Señora de Fátima (Vigo). Las clínicas enviaron estas muestras a laboratorios especializados para realizar una evaluación por FISH, con el fin de valorar la existencia de aneuploidías cromosómicas.

3.2 REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO

3.2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados se muestran en la Tabla.... Fueron adquiridos de Electron Microscopy Sciences (EMS) (Hatfield, Inglaterra), Sigma-Aldrich (Madrid, España/ St. Louis, MO,EEUU), VWR (Barcelona, España). Los fluorocromos se compraron a Invitrogen (Eugene, OR, USA). Los consumibles para citometría de flujo se adquirieron de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) o Becton Dickinson (San José, CA, USA). Para la preparación de los medios se utilizó agua milli-Q (Tabla 3).

3.2.2 Equipamiento

El equipamiento utilizado se muestra en la Tabla... Se adquirió de las empresas , Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) , Becton Dickinson (San José, CA, USA), Dako (Glostrup, Alemania), Eppendorf (Hamburgo, Alemania), JP-Selecta (Barcelona, España), Marienfeld-GmbH (Marienfeld, Alemania), Mettler-Toledo (Kern, EEUU), Millipore (Madrid, España), Nikon (Tokio, Japón), Sefi Medical (Haifa, Israel), Telstar (Madrid, España) (Tabla 4).

3.2.3 Soluciones stock y medios

Solución PBS 10X

Esta solución se compone de cloruro de sodio (1370 mM), cloruro de potasio (27 mM), fosfato de sodio dibásico (100 mM) y fosfato de potasio monobásico (17 mM). Las cantidades de cada componente se pesaron en la báscula de precisión. Una vez pesadas todas las cantidades, se añadió un volumen de agua milli-Q o ultrapura para la disolución. Se enrasó al volumen y final y se midió el pH ajustándolo a 7,4 con el pHmetro. Se filtró la solución en la campana de flujo laminar, mediante el uso de filtros de diámetro de poro 0,2 μm . La solución se almacenó a temperatura ambiente.

Solución PBS (1X)

Se diluyó la solución PBS en relación 1/10. Para ello se utilizó agua milli-Q. La solución se guardó en la cámara fría, a 4°C.

Solución de TNE (Tris/ NaCl/EDTA) 10X

En este estudio se utilizaron muestras que se habían diluido en una solución de TNE (para evitar daños en el ADN) antes de congelarlas a -80 °C. El TNE es un medio tamponado, ampliamente utilizado en biología celular y molecular. Esta solución se compone de Tris-HCl (100mM), cloruro de sodio (1,5mM) y EDTA disódico dihidratado (10mM). Los reactivos se diluyeron en agua milli-Q para alcanzar las concentraciones finales que se indican en la Tabla Se ajustó el pH a 7,4 mediante la utilización de NaOH 2 N. La solución se almacenó a 4°C. Esta solución puede tener una duración de un año.

Solución de TNE de trabajo (1X)

La solución de trabajo es TNE 1X. Se diluye la solución stock 1/10 con agua bidestilada. Se comprobó que el pH se mantenía a 7,4. Esta solución de trabajo se puede conservar a 4°C durante varios meses.

Solución de lavado con BSA al 0,5% (PBS-BSA)

Se partió de la solución de PBS y se añadieron 5 mg de de albúmina sérica bovina (BSA) por mL de solución (0,5% p/v).

Etanol 70%

Se añadieron 30 mL de agua milli-Q por cada 70 mL de etanol absoluto para obtener etanol al 70%. Esta solución se mantuvo en un congelador a -20°C.

Solución estabilizadora de la cromatina (PBS-PFA)

Para realizar esta solución se añadió paraformaldehído a la solución de PBS. El paraformaldehído se adquirió como una solución ultrapura de formaldehído en agua al 8%. Se añadieron 62,5 µl/ml de esta solución al PBS para dejarlo al 0,5%. La solución se mantiene a 4°C. Las ampollas de donde se obtiene el paraformaldehído, se mantienen a temperatura ambiente y una vez abierta, se deben conservar a 4°C.

Solución de ditioneitol (DTT)

El DTT se adquirió como solución a 1 M en agua. Se prepararon alícuotas con el fin de evitar contaminación. Se conservaron las alícuotas en la cámara a 4°C.

Preparación de heparina

La heparina se disolvió con agua milli-Q hasta una concentración final de 180 U/mL. Se realizaron alícuotas que se conservaron a 4 °C.

Solución PBS-Triton

Se preparó una solución de Triton X-100 al 0,1% en PBS. Para añadir el Triton X-100 fue necesario cortar la punta de la pipeta, ya que el Triton es muy viscoso. Tras pipetear, la punta se expulsó al vaso de precipitados, dejando unos minutos en agitación. Esta solución se almacenó a 4°C.

Tabla 3. Reactivos utilizados

CASA COMERCIAL	COMPUESTO	REFERENCIA
Sigma -Aldrich	Albúmina sérica bovina	A9647
	Cloruro de potasio	P5405
	Cloruro de sodio	S9625
	Heparina	H3149
	Fosfato de potasio monobásico	P5655
	Fosfato de sodio dibásico	S5136
	Tritón X-100	T9284
	Ribonucleasa de páncreas de bovino (libre de ADNasa)	R5000
	Ioduro de propidio (IP)	P4171
VWR	Etanol absoluto	20801.310
	Ditiotreitol (DTT)	A3668.0050
EMS	Paraformaldehído 8%	157-8

Tabla 4. Equipamiento

CASA COMERCIAL	EQUIPAMIENTO	MODELO REFERENCIA
JP-Selecta	Agitador	Agimatic-ED
Eppendorf	Agitador termostatzado	Termomixer Comfort
Millipore	Agua Milli-Q, dispensador	Milli-Q
Mettler-Toledo	Balanza de precisión	AE-200
JP-Selecta	Baño de agua	Precistern
Marienfild-GmbH	Bürker, cámara	
Telstar	Cámara de flujo laminal	Biostar
Eppendorf	Centrifuga	MiniSpin
Becton Dickinson	Citómetro de flujo	FACSCalibur™
Dako	Citómetro de flujo	CyAN ADP
Sefi Medical	Makler, cámara	
Nikon	Microscopio confocal	TE2000U asociado con D-Eclipse C1
Nikon	Microscopio fluorescencia	Eclipse E-600
Nikon	Microscopio óptico	Eclipse E-400
Mettler Toledo	pHmetro	SevenMulti
JP-Selecta	Termobloque	Multiplaces

Solución de descondensación de la cromatina

Antonucci et al. (2012) optimizaron la concentración de DTT para descondensar el núcleo espermático en distintas especies. En el cerdo la cantidad necesaria es 20 mM y en humano basta con 5 mM de DTT. Por ello, realizamos dos soluciones utilizando como base el medio PBS-Triton, una para muestras de cerdo y otra para muestras de humano. A ambas soluciones se les añadió la solución de heparina hasta una concentración final de 100 U/mL.

Cada día de experimento, se prepararon las soluciones con las cantidades necesarias en función de las muestras que teníamos para analizar ese día. La solución de descondensación se almacenó en la cámara fría a 4°C hasta su utilización.

Solución stock de yoduro de propidio (IP)

Se realizaron alícuotas de yoduro de propidio a 1 mg/ml en agua (1,5mM) y se almacenaron a -20 °C en oscuridad.

Solución stock de ARNasa

Se preparó una solución stock a 10 mg/mL en agua y se almacenó a -20°C.

Solución de tinción

La solución de tinción se preparó fresca cada día. Se utilizó la solución de PBS-Triton como base. Se añadió solución stock de IP hasta 40 µg/mL y ARNasa hasta 0,1 mg/mL. Hasta su uso, la solución de tinción se guardó a 4 °C cubierta de papel de aluminio para mantenerla en oscuridad.

3.3 PROTOCOLOS DESCRITOS EN LA BIBLIOGRAFÍA

Protocolo estándar para detección de aneuploidías (Lazaros et al., 2011)

Se utilizaron muestras de semen que previamente se habían diluido con TNE a 2 mill./mL y se conservaron a -80°C . Se descongelaron las muestras en un baño de agua a 37°C hasta que desapareció todo el hielo. Mediante el uso de las cámaras de recuento y el sistema ISAS se comprobó la concentración espermática y se ajustó en caso necesario. Se colocaron las muestras en hielo y se añadieron 0,5 ml de PBS-BSA. Se realizó una centrifugación a $800\times g$ durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Se añadió 1 ml de etanol 70% y se incubaron las muestras a una temperatura de -20°C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se volvió a realizar una centrifugación y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de solución de tinción y se mantuvieron los tubos 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente antes de analizar las muestras en el citómetro de flujo.

Protocolo con descondensación del núcleo espermático (Antonucci et al., 2013)

Según estos autores, el grado de condensación variable de la cabeza espermática puede alterar la tinción del núcleo, haciendo que la cuantificación de la cantidad de ADN no sea fiable. Proponen un método para descondensar la cabeza sin destruir la estructura.

Las muestras que utilizamos estaban congeladas a -80°C en una solución de TNE. Se descongelaron las muestras en un baño de agua a una temperatura de 37°C . Se tuvo que esperar a que las muestras no presentaran hielo antes de sacarlas del baño. A las muestras se les añadieron 0,5ml de PBS-BSA y se centrifugaron a 800g durante 5 minutos. Después, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió cada muestra en 500 μl de la solución de PBS-PFA. Se incubaron las muestras durante 10 min en un agitador termostático en agitación, oscuridad y a una temperatura de 4°C . Se lavaron las muestras con 0,5 ml de PBS-BSA y se sometieron a una centrifugación igual que la anterior.

Una vez eliminado el sobrenadante, se añadieron 600µl de la solución de descondensación de la cromatina correspondiente a la especie que correspondía cada muestra. Se dejaron las muestras incubando en un termobloque que mantiene la temperatura constante a 25°C durante 30 minutos y en condiciones de oscuridad. Se volvieron a lavar las muestras con 0,5ml de PBS-BSA y se sometieron a otra centrifugación como las anteriores. Después de retirar el sobrenadante, se añadió 1ml de etanol 70% por muestra y se dejaron las muestras incubando durante 2 horas a una temperatura de -20°C. Transcurrido ese tiempo, se realizó una centrifugación y se eliminó el sobrenadante para añadir la solución de tinción. Se esperaron 30 minutos de incubación en esta solución para poder analizar las muestras en el citómetro de flujo.

3.4 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA MEDIANTE EL EQUIPO INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM (ISAS®)

Se realizaron medidas de la concentración de manera individual utilizando el programa informático Integrated Semen Analysis System (ISAS®, Proiser, Valencia, España).

Para la realización de esta prueba se utilizaron las cámaras de recuento tipo Makler o tipo Bürker (Figura 8) y un microscopio óptico, que cuenta con una óptica de contraste de fases negativo. La captura de las imágenes se realizó con un objetivo 10X y una cámara Basler A312f (Basler AG, Ahrensburg, Alemania) conectada por Firewire al ordenador. En el ordenador personal se instaló el programa ISAS®.

La cámara de recuento Makler se compone de dos piezas de vidrio óptimamente planas. La parte superior sirve de cubreobjetos y cuenta con una retícula de 0,1 x 0,1 mm de lado con 100 cuadrados. El número de espermatozoides contenidos en 10 cuadrados indica la concentración en millones por mililitro, siendo un sistema rápido para contar manualmente.

La cámara de recuento tipo Bürker también se utilizó para el análisis de la concentración espermática, sobre todo para muestras diluidas. En este tipo de cámaras se pegó el cubreobjetos a la cámara y posteriormente se cargaron las cámaras con las muestras. Fue necesario dejar incubar en una cámara húmeda la muestra 5 minutos.

Con ambas cámaras se analizaron las muestras con el sistema CASA. Se capturaron al menos 4 campos distintos por muestra, y se estimó la concentración utilizando el algoritmo de reconocimiento automático de las cabezas espermáticas, obteniendo la concentración en millones de células/mL.

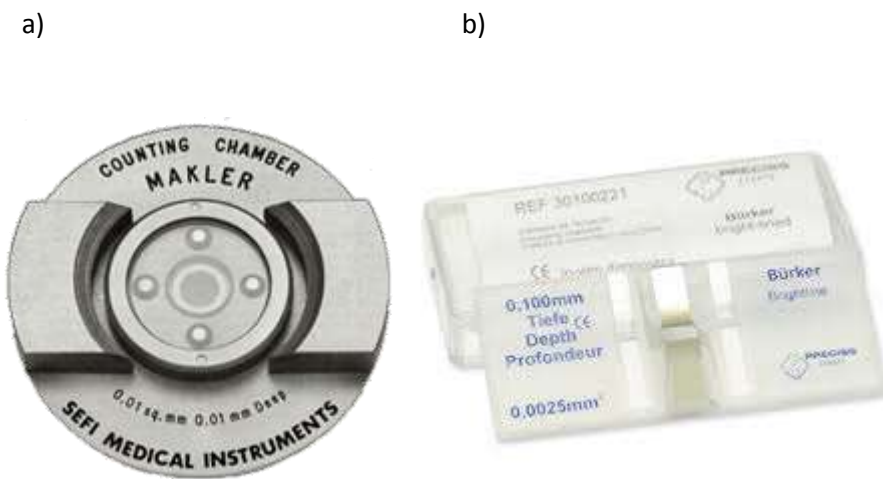


Figura 8 . La figura a) representa una cámara de recuento tipo Makler. En la figura b) se ve una cámara de recuento tipo Bürker.

3.5 ANÁLISIS SCSA

El ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) se ha convertido en una herramienta importante para la evaluación de la estabilidad de la cromatina espermática. El SCSA utiliza las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina (AO) en combinación con la citometría de flujo (Evenson y Jost, 2000) para determinar a susceptibilidad del ADN del espermatozoide a la desnaturalización in situ (Love, 2005). Se basa en la resistencia a la desnaturalización del DNA (supuestamente, menor si hay roturas en la hebra) y en las propiedades del colorante metacromático naranja de acridina. El naranja de acridina emite fluorescencia de color verde cuando se une a ADN de doble hebra, y de color rojo cuando se une a ADN de hebra sencilla.

La muestra se analiza por citometría de flujo, y el diagnóstico se realiza a partir de la relación entre la fluorescencia roja y la fluorescencia total, llamando a este factor DFI (índice de fragmentación de ADN). A partir del DFI se extraen varios parámetros que permiten estimar el daño al material genético de los espermatozoides. Otro parámetro de estudio es el que calcula el porcentaje de células inmaduras (HSD).

Es necesario realizar este procedimiento de una manera altamente estandarizada y repetible, ya que será influido por numerosos factores si estos no se controlan.

El protocolo está detallado en Evenson y Jost, (2000).

- Soluciones

La preparación de las soluciones se explica en el ANEXO 1.

- Procedimiento

Se utilizaron muestras de semen que se presentaban congeladas en la solución de TNE a -80°C . Se precisó de un soporte con hielo húmedo donde se colocaron las botellas, previamente preparadas, de la solución detergente-ácida y la solución de tinción. A continuación se llevó a cabo la descongelación de las muestras. Antes de introducirlas en el baño de agua a 37°C , se mantuvieron en hielo húmedo durante 10 minutos. Se colocaron los tubos de citometría en hielo y se transfirió $200\mu\text{l}$ de cada muestra a su tubo correspondiente. A continuación, se añadió $400\mu\text{l}$ de la solución de detergente-ácida y a los 30 segundos exactamente, se añadió $1,2\text{ mL}$ de la solución de tinción. Después de 2 minutos, se comenzó el análisis con el citómetro. Este punto es muy crítico, ya que tiempos demasiado largos pueden producir sobretinción.

Se ajustó la región de adquisición para excluir debris y no excluir células. La velocidad de flujo se situó entre 200-150 eventos por segundo. Primero se analizó en modo setup durante unos segundos, para después de 1 minuto proceder al guardado de los datos.

3.6 ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

En este trabajo se utilizó un citómetro de flujo modelo FACSCalibur™ (figura 9), que se encuentra en el servicio de Microscopía de la Universidad de León. El citómetro está equipado con un láser azul ion-argón Cryonics de 15 mW operando a una longitud de onda de 488 nm. Se obtuvieron en modo logarítmico la señal FSC (forward scattered light) y SSC (side scattered light). La señal SSC fue detectada por un fotomultiplicador IP28. El citómetro cuenta con tres fotomultiplicadores con diferentes filtros para detectar fotones en el rango del verde, naranja y rojo (Figura 9a). En nuestros experimentos utilizamos la información de los fotodetectores FL-2 y FL-3, dotados de un fotomultiplicador FMT R1477, ya que coinciden con el rango de emisión del IP. La emisión fluorescente naranja fue recogida por el fotodetector FL-2, con un filtro 585/42BP (Figura 10). La emisión roja fue recogida por el fotodetector FL-3, con un filtro 670LP. Se analizaron 10.000 células por muestra. Los datos fueron adquiridos con el programa CellQuest v.3.3 (Becton Dickinson) y analizados con el programa Weasel v.2.6 (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Victoria, Australia).

El citómetro de flujo CyAN ADP (Figura 9b) utiliza tres líneas de excitación láser independientes (488nm a 20mW, 635 nm a 27,5mW y 405nm a 27,5mW) y nueve detectores de fluorescencia. Con la emisión del láser de 488 nm recogimos los fotodetectores FL2-575/25 nm, FL3-613/20 nm (Figura 11).

Se analizaron 10.000 células por muestra. Los datos fueron recogidos por el software Summit v.4.3 (Windows®) y analizados con el programa Weasel v.2.6 (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Victoria, Australia).

a)



b)



Figura 9. Citómetro de flujo

La figura a) muestra un citómetro tipo FACSCalibur. En la figura b) se puede observar un citómetro tipo CyAn ADP.

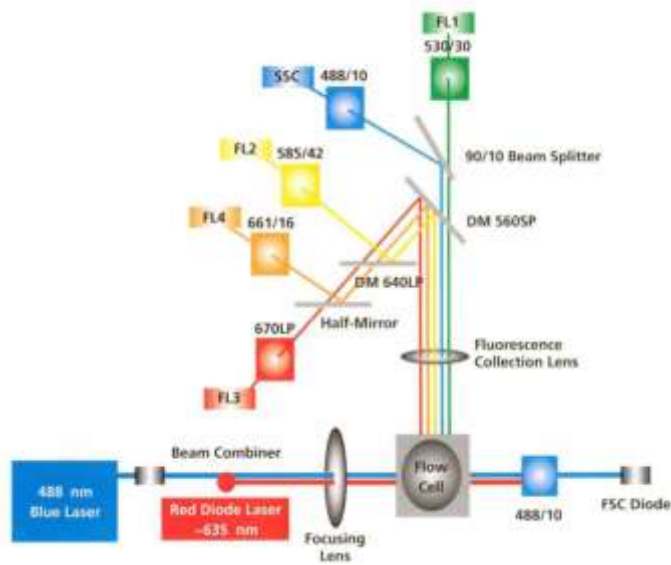


Figura 10. Esquema de la configuración óptica del citómetro de flujo FACSCalibur.

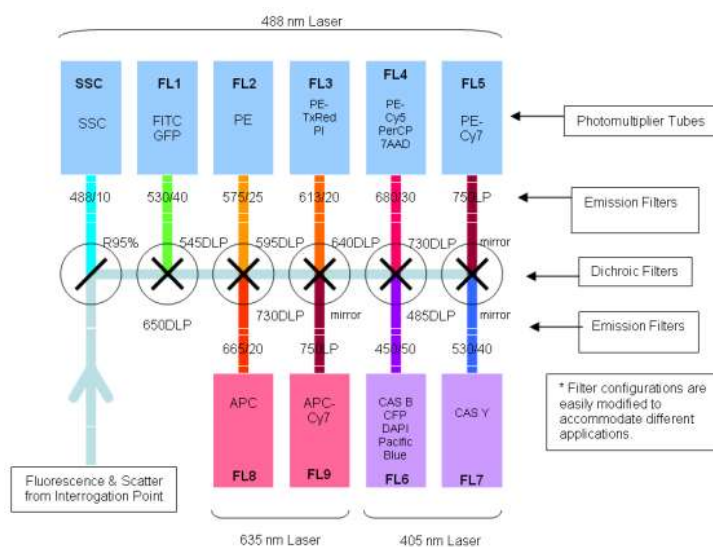


Figura 11 . Esquema de la configuración óptica del citómetro CyAN APD

3.7 ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Los análisis microscópicos se realizaron con un microscopio de fluorescencia convencional y un microscopio confocal (Figura 12), en el Servicio de Microscopía de la Universidad de León. El microscopio de fluorescencia Eclipse E-600 cuenta con una cámara digital DXM200 (Nikon, Japón) acoplada al equipo (Figura 12a). El equipo cuenta con tres filtros de excitación, espejo dicróico y filtros de emisión. Las imágenes se capturaron en formato TIFF con el software Nikon NIS-Elements v.2.2.

Los análisis de microscopía confocal se llevaron a cabo con un equipo formado por un microscopio óptico invertido con sistema confocal que lleva acoplado un sistema de láser (Figura 12b). En este trabajo se han utilizado el láser verde, con una longitud de onda de 543 nm. El sistema confocal de escaneo incorpora el software EZ-C1 para configurar todos los parámetros de operación. El procesamiento de datos y captura de imágenes se llevo a cabo mediante un software de imagen Nikon EZ-C1 Viewer v3.6.

a)



b)



Figura 12. En la figura a) se ilustra el microscopio de fluorescencia. En la figura b) se muestra el equipo confocal.

3.8 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE CITOMETRÍA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos se analizaron en el programa Weasel utilizando una plantilla que permitía eliminar los eventos no espermáticos, definir la población espermática de interés y generar histogramas de la fluorescencia recogida por FL-2 y FL-3. En estos histogramas se definieron regiones para cuantificar los espermatozoides nulisómicos (menos intensidad de fluorescencia de ADN), espermatozoides haploides normales (n), células inmaduras (espermátidas descondensadas), espermatozoides con mayor carga de ADN (mayor fluorescencia), células 2n y células 4n. Estas regiones se definieron tomando como referencia las muestras estándar. Se recogieron el número y % de células y valor medio, mediano y %CV de la fluorescencia, tanto de la población total como de cada región (Figura 13).

Los datos se procesaron utilizando el entorno estadístico R (v.3.1.0). Se obtuvieron los estadísticos descriptivos para cada parámetro y grupo experimental. Los tratamientos se compararon utilizando modelos lineares mixtos, para evaluar si existían diferencias consistentes entre ellos.

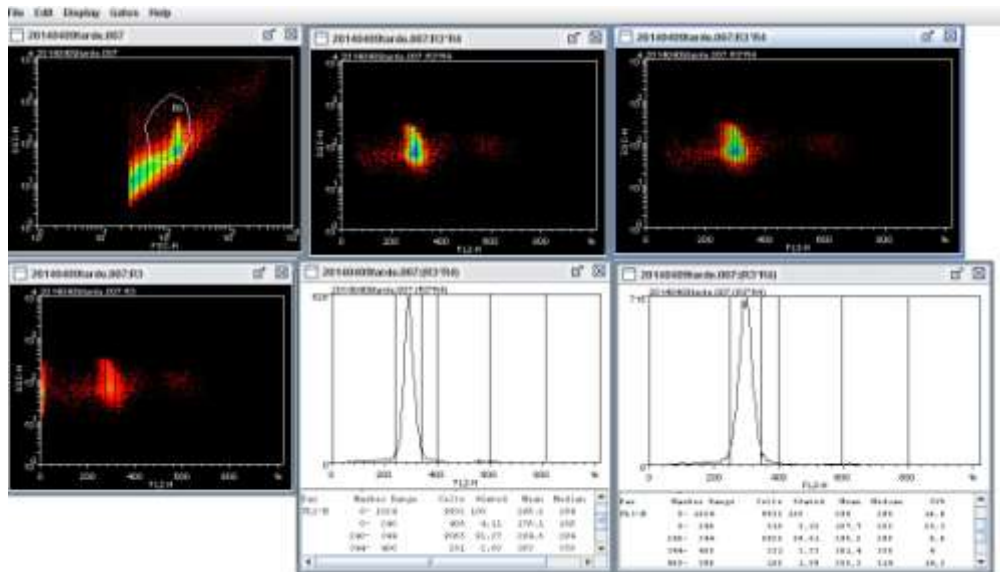


Figura 13 . Plantilla utilizada en el análisis con el programa Weasel.

4. RESULTADOS

4.1 Ajuste del citómetro de flujo

Todas las muestras fueron procesadas con el citómetro de flujo FACSCalibur™. El ajuste de las distintas poblaciones lo realizamos en base a los histogramas encontrados consultando la bibliografía (Kacker-Klom et al.199; Koscinski et al. 2005; Weissenberg et al.1988; Yeung et al.2007). En ellos el eje de las x está representado por la intensidad de la fluorescencia, y en el eje de las y se representa el número de células con su correspondiente intensidad de fluorescencia. Consultando los artículos de varios autores, existe una uniformidad en cuando a la clasificación de las células, pudiendo clasificarlas en seis regiones como hemos hecho en nuestro trabajo. Hemos creado seis regiones en las que clasificar las posibles poblaciones. De la región 1 a la región 6: espermatozoides nulisómicos (n-i) que presentan menor carga cromosómica que la que les corresponde, haploides maduros (n), haploides con la cromatina poco condensada (inmaduros), espermatozoides disómicos (n+i) con mayor carga cromosómica, diploides (2n) y poliploides (>2n) (Figura 11). Con ayuda del software CellQuest se ajustó la población central, haploides maduros, la cual se mantuvo en todas las muestras en torno al canal 300 de fluorescencia del IP. Se realizó una plantilla de análisis específica para cada técnica y especie, para asegurar la repetibilidad entre muestras y días. Los valores de voltaje y otros parámetros aplicados al citómetro en cada caso se guardaron también como referencia.

Este procedimiento se realizó también con el citómetro CyAn ADP, cuando se realizó una lectura doble en ambos sistemas.

Se realizó una distinción a la hora de colocar los marcadores, con el programa Weasel, entre las dos técnicas utilizadas, basadas en los procedimientos seguidos por Antonucci et al. (2013) y Lazaros et al. (2011). Estas diferencias se plasmaron en el intervalo que recogía los parámetros de la población central.

En las muestras del protocolo de Antonucci et al. la anchura del intervalo que recogía el pico de la población de espermatozoides haploides maduros fue menor que en las otras muestras del protocolo de Lazaros et al.(2011). Además, en las muestras que siguieron el protocolo de Antonucci et al., ese pico correspondiente a los espermatozoides haploides maduros se vio más definido. En cambio, las muestras que siguieron el procedimiento de Lazaros et al. mostraron un pico principal más ancho y menos definido (Figura 14).

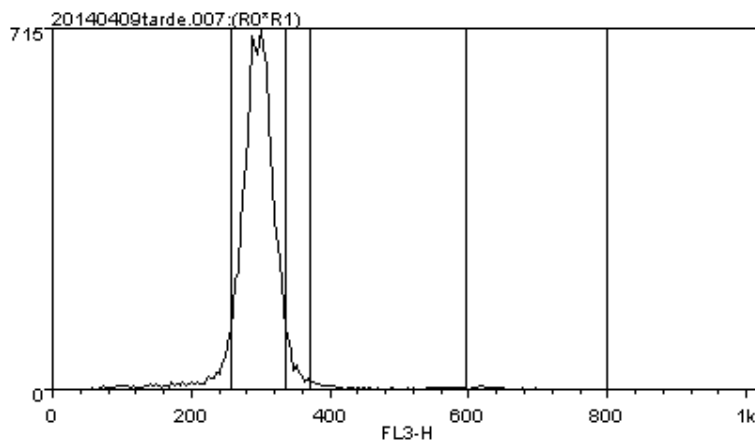


Figura 14. En este histograma se puede ver las regiones que hemos utilizado para realizar nuestra estimación. De izquierda a derecha, región 1 correspondiente a las células ($n-i$), región 2 correspondiente a los espermatozoides haploides (n), región 3 mucho más pequeña correspondiente a las células haploides inmaduras, región 4 relacionada con las células ($n+i$), región 5 con diploides ($2n$) y región 6 que corresponde con las células poliploides ($>2n$).

4.2 Experimento 1. Realización de los protocolos sin modificaciones

En este experimento se llevaron a cabo los procedimientos detallados por Antonucci et al., (2013) y Lazaros et al., (2011). Se realizó el análisis independientemente en las muestras de humano y cerdo y de las técnicas empleadas. El ajuste de los marcadores lo realizamos en relación a la técnica y a la especie.

Tras eliminar los eventos no espermáticos de la muestra (utilizando las señales FSC/SSC y FL3/SSC), analizamos la distribución de la población espermática según la fluorescencia del IP. Para ello utilizamos histogramas para representar la señal de los fotodetectores FL2 y FL3. Encontramos un pico bien definido, correspondiente a los espermatozoides haploides maduros (Figura 15), siendo más raro encontrar eventos en las otras regiones (las muestras analizadas en este experimento eran de buena calidad).

Adaptamos los marcadores a cada tipo de técnica utilizada. Comparando los resultados obtenidos, podemos ver que en las muestras en las que se realizó el protocolo de Antonucci et al., la población central se ve representada por un pico más definido y estable. En cambio, en las muestras de Lazaros et al. el pico que representa a la población espermatozoides haploides fue más ancho y con menor definición.

Los resultados comparando ambas técnicas son muy similares. En ambas se encuentran unos porcentajes parecidos de las células presentes en cada región, obteniéndose el pico en la región de células haploides maduras (n) (Tabla 5).

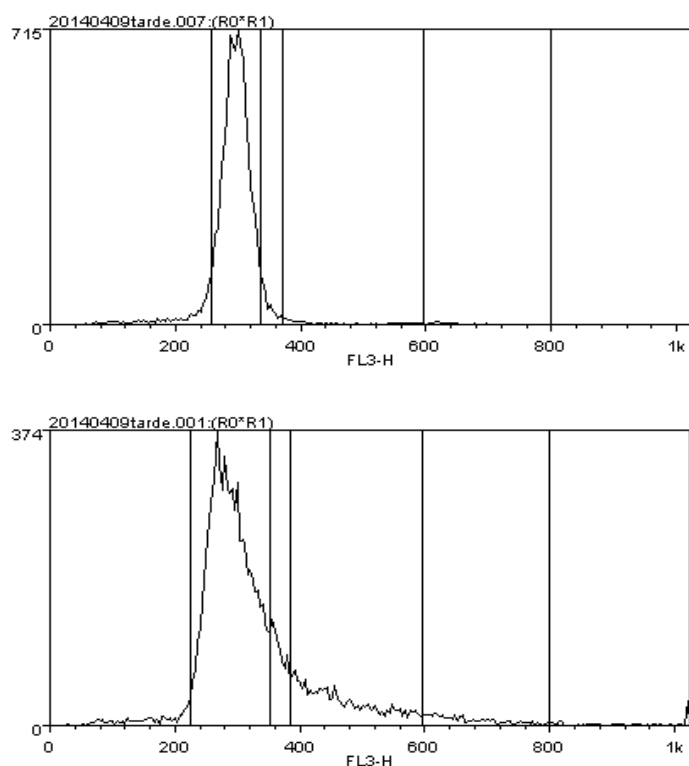


Figura 15. Histograma humano.

En la parte superior se representa el histograma de la muestra de humano que siguió el protocolo de Antonucci et al. En la parte baja, el histograma representa el la técnica de Lazaros et al. Como se puede comprobar el ajuste de la población de haploides con la técnica de Antonucci et al. da como resultado un pico más afinado en comparación con el obtenido por Lazaros et al. En esta última en la anchura del pico es mayor, y no se observa un pico fino. Los histogramas fueron obtenidos del software Weasel.

Tabla 5. Representación de la proporción de células encontrada en cada una de las regiones en las que se dividió el histograma de la fluorescencia del IP, para cada una de las técnicas. Los datos indican el valor medio y la desviación estándar (%). Los datos corresponden a la especie humana.

Técnica	Región1	Región2	Región3	Región4	Región5	Región6
Antonucci et al (2013)	6±1,3	69±5,2	7,9±0,9	8,1±1,7	2,8±1	0,8±0,3
Lazaros et al. (2011)	6,1±1,5	69,1±3,5	9,7±1	10,4±1,2	3,2±0,6	0,9±0,3

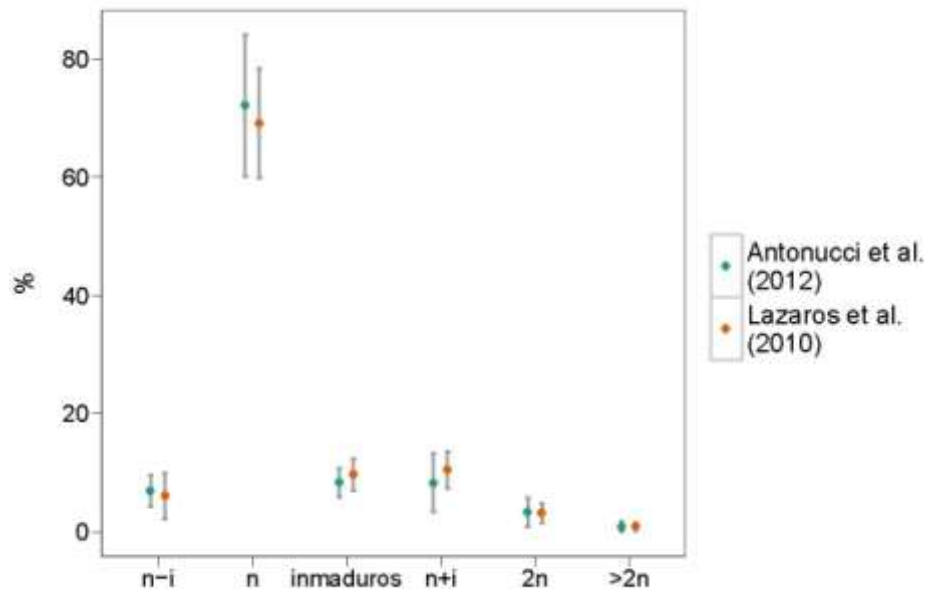


Figura 16. En el histograma se diferencian las dos técnicas y la proporción de células que se encontraron en cada región. Como se puede observar, en la región 2, donde se situarían los espermatozoides haploides (n), es donde mayor número de células obtenemos. En el eje de las x se representa el porcentaje de células, mientras que en el eje de las y se encuentran las poblaciones de células en sus correspondientes regiones.

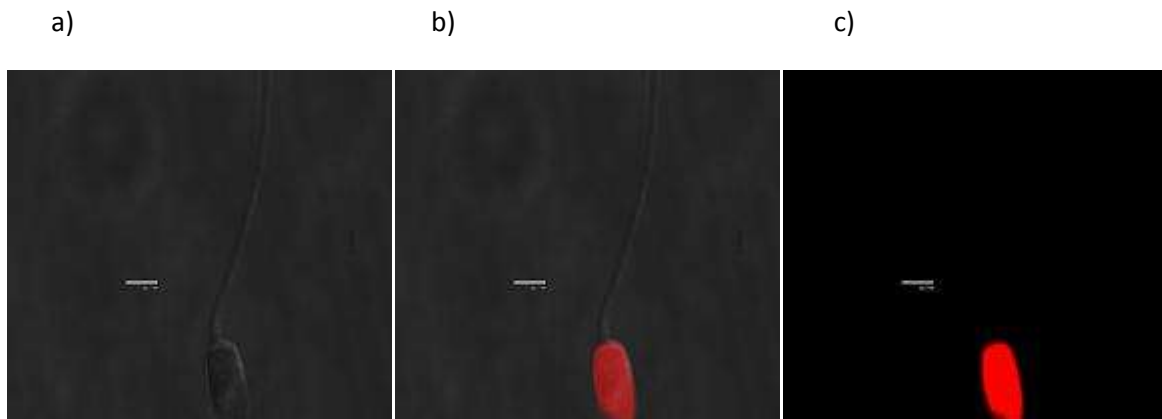


Figura 17. La figura muestra un espermatozoide humano mediante la técnica de Antonucci et al. La cabeza se encuentra teñida con el IP que contenía la solución de tinción. Todas figuras fueron tomadas con el microscopio confocal. La figura a), muestra la imagen en dimensiones, tomada con el equipo confocal. La figura c) usa la técnica de fluorescencia. Y la figura del medio intercala ambas técnicas.

En cerdo realizamos una nueva plantilla para la colocación de los marcadores, atendiendo a la especie y la técnica a utilizar. Encontramos una mayor definición de los picos con la técnica de Antonucci et al. (2013) en relación a la técnica de Lazaros et al. (2011) donde se consigue un poco más ancho y con más variabilidad (Figura 18). Respecto a los porcentajes de células por región, sigue apareciendo el mayor porcentaje en la población de haploides maduras (n). Comparativamente los porcentajes resultantes coinciden en ambas técnicas (Tabla 6).

En la técnica de Lazaros et al. (2011) es más evidente una población a la derecha, aunque posiblemente se trate de un artefacto por aglutinación. Esto no se observa tan notablemente en las muestras de Antonucci et al. (2013). El fenómeno de aglutinación ocurre solamente en las muestras de cerdo.

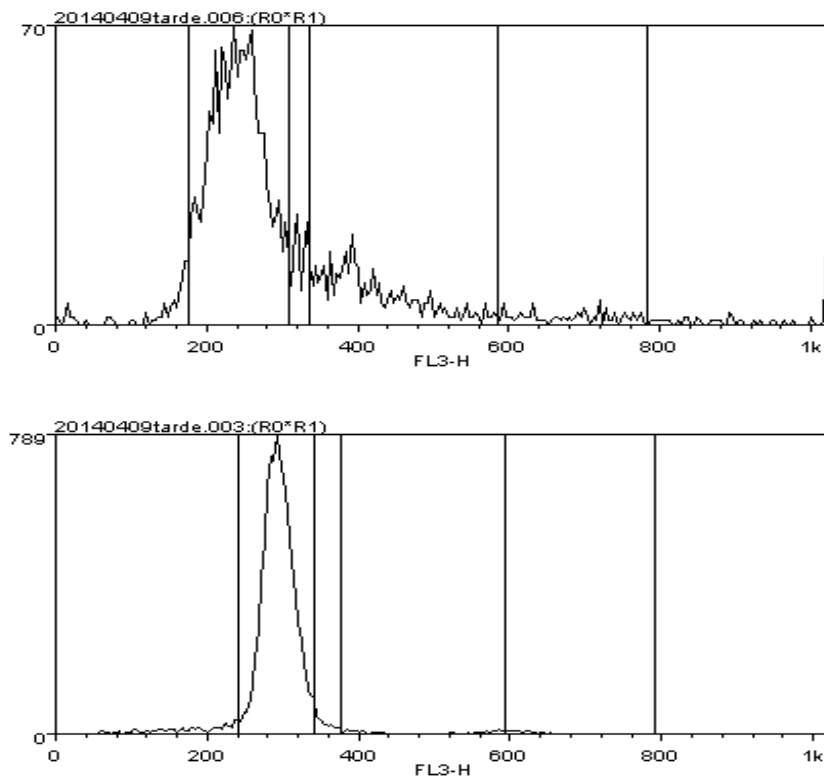


Figura 18. Representación del histograma cerdo.

En la parte superior se representa el histograma de una muestra de cerdo que se procesó según el protocolo de Lazaros et al. (2011), En la parte inferior se representa el histograma resultante de procesar la misma muestra con la técnica descrita por Antonucci et al. (2013). Los histogramas fueron obtenidos con el software Weasel. En el eje de las x se representa la intensidad de fluorescencia y en el eje de las y, el número de células con su correspondiente intensidad de fluorescencia.

Tabla 6 . Representación de la proporción de células encontrada en cada una de las regiones en las que se dividió el histograma de la fluorescencia del IP, para cada una de las técnicas. Los datos indican el valor medio y la desviación estándar (%). Los datos corresponden a la especie de cerdo.

Técnica	Región1	Región2	Región3	Región4	Región5	Región6
Antonucci et al (2013)	7,4±1,3	62,2±2,4	9,1±0,8	14,4±1,9	5,1±0,7	1,5±0,4
Lazaros et al. (2011)	4,1±1,1	67,3±2,3	7,7±0,8	15,3±1	3,9±0,9	1,2±0,3

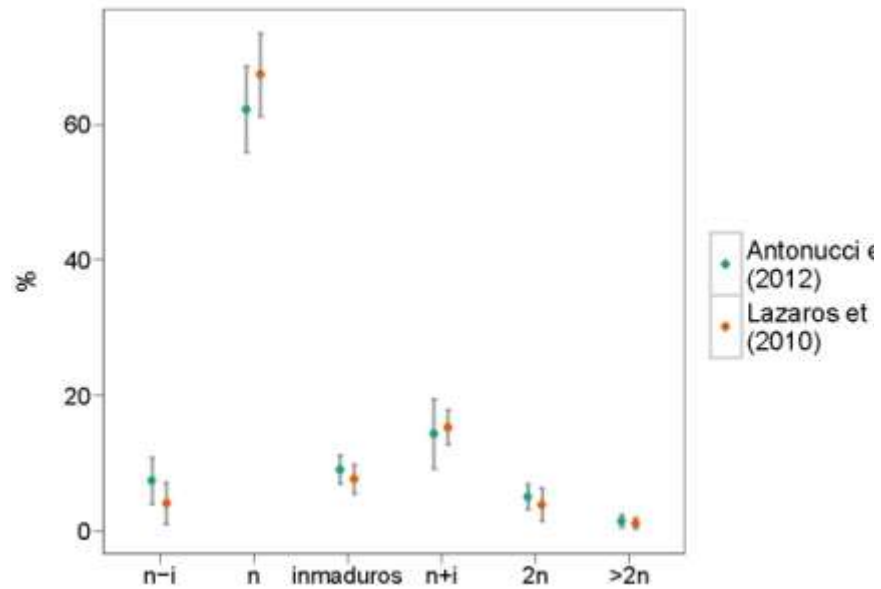


Figura 19. Se diferencian las dos técnicas y la proporción de células que se encontraron en cada región. Como se puede observar, en la región 2, donde se situarían los espermatozoides haploides (n), es donde mayor número de células obtenemos. En el eje de las x se representa el porcentaje de células, mientras que en el eje de las y se encuentran las poblaciones de células en sus correspondientes regiones. La figura corresponde a las muestras de cerdo.

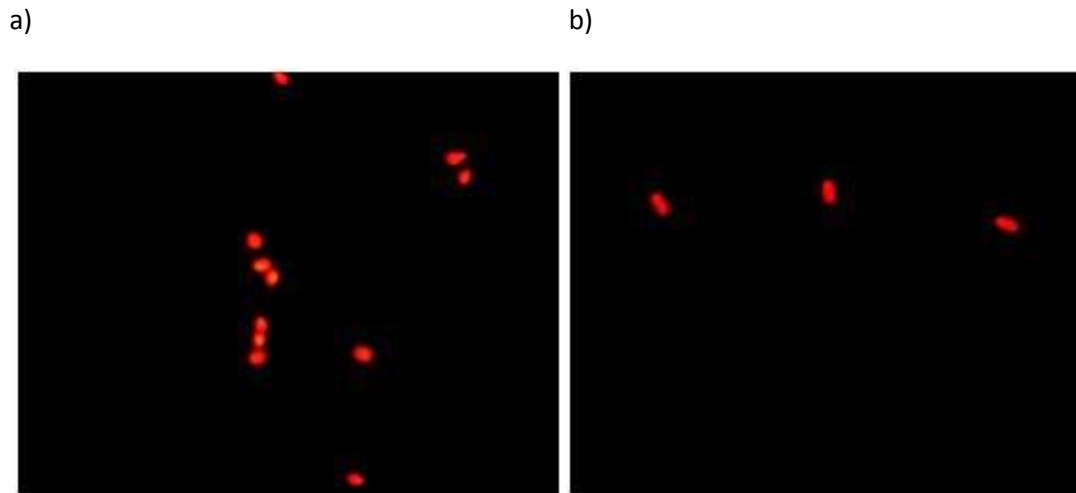


Figura 20 . En la imagen se muestran dos poblaciones de espermatozoides teñidos con IP mediante microscopía de fluorescencia. La figura a), corresponde a espermatozoides humanos. La figura b) son espermatozoides de cerdo. . Los espermatozoides humanos son más pequeños que los de cerdo, y tienen mayor grado de fluorescencia. La imagen de humano está tomada a 40 aumentos. La de cerdo está tomada a 20 aumentos.

En las dos especies se encontró una reducción del número de células de la muestra. Cuando pasamos las muestras por el citómetro, la velocidad de tránsito (eventos/segundo) era muy baja para ambas especies. En la técnica de Antonucci et al. (2013) se presentó algo más de pérdida debido a los numerosos pasos de centrifugación que acontecen el procedimiento. En cerdo, el fenómeno de aglutinación, nos hace deducir que algo está ocurriendo en el procedimiento para que las células formen aglomerados durante el procedimiento. Esto reduce la velocidad en el citómetro, indicándonos que existe una disminución del número de células en relación al que partíamos al comienzo de todo el proceso. A pesar de no observarse en humano el fenómeno de aglutinación, también existe una pérdida de células. Esta pérdida, como en cerdo, es más notable con el protocolo de Antonucci et al. (2013). Con la técnica de Lazaros et al. (2011) existe una menor pérdida de células en ambas especies.

Como la pérdida de células se produce con las dos técnicas realizamos el experimento 3 comprobando si el fenómeno de aglutinación ocurre si optimizamos las dos técnicas eliminando el paso de fijación en etanol (Figura 21,22).

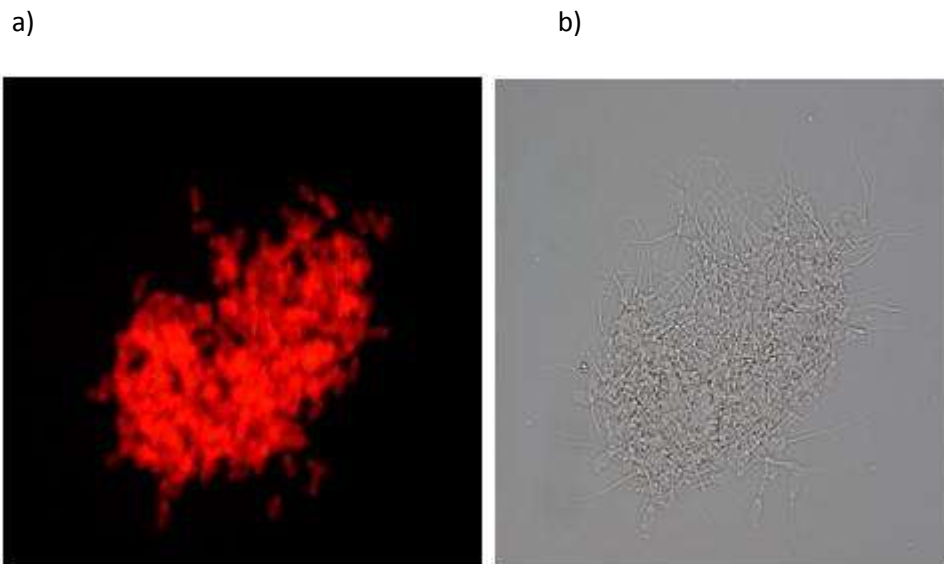


Figura 21. En las muestras de cerdo se presentó un problema de aglutinación de los espermatozoides (posteriormente asociado a la realización del paso de fijación con etanol). En la figura de la izquierda (a), se muestra una imagen realizada en el microscopio de fluorescencia con el filtro verde. A la derecha, la misma imagen en realizada en campo claro (b). No se observó este efecto en las muestras de humano.

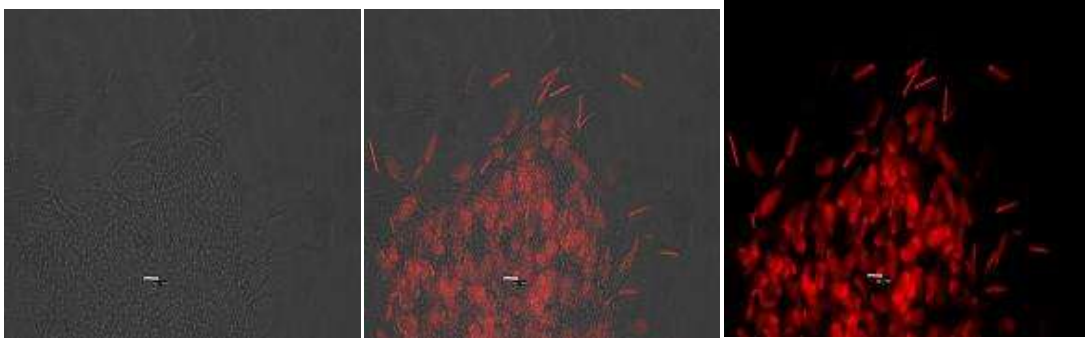


Figura 22. La figura representa el fenómeno de aglutinación que sucede en las muestras de cerdo siguiendo ambos protocolos. Las imágenes fueron tomadas mediante el uso de la microscopía confocal, utilizando las características propias del microscopio confocal y la microscopía de fluorescencia. La escala corresponde a $5,1\mu\text{m}$.

4.3 Experimento 2. Estabilidad de la tinción durante la conservación en frío.

En este experimento se procesaron muestras de humano y cerdo con ambas técnicas. Tras realizar los procedimientos, las muestras se analizaron, se guardaron en oscuridad y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se volvieron a analizar a las 2 y 4 horas. En algunos casos se realizaron lecturas a las 24 y 48 h.

Variando las condiciones de tiempo, en humano se obtuvieron unos resultados prácticamente idénticos en las tres medidas a tiempos de 0, 2 y 4 horas. A las 0 horas se ajustó la población mayoritaria modificando el voltaje de los fotodetectores (FL3-H y FL2-H), manteniendo esta configuración en las siguientes lecturas. En todos los casos, el pico principal se mantuvo en la misma posición entre distintas medidas (Figura 23). Ambas técnicas obtuvieron un pico que correspondió con las células haploides maduras. Como ocurrió con anterioridad, la técnica de Antonucci et al. (2013) consiguió un pico más definido que las muestras procesadas mediante la otra técnica.

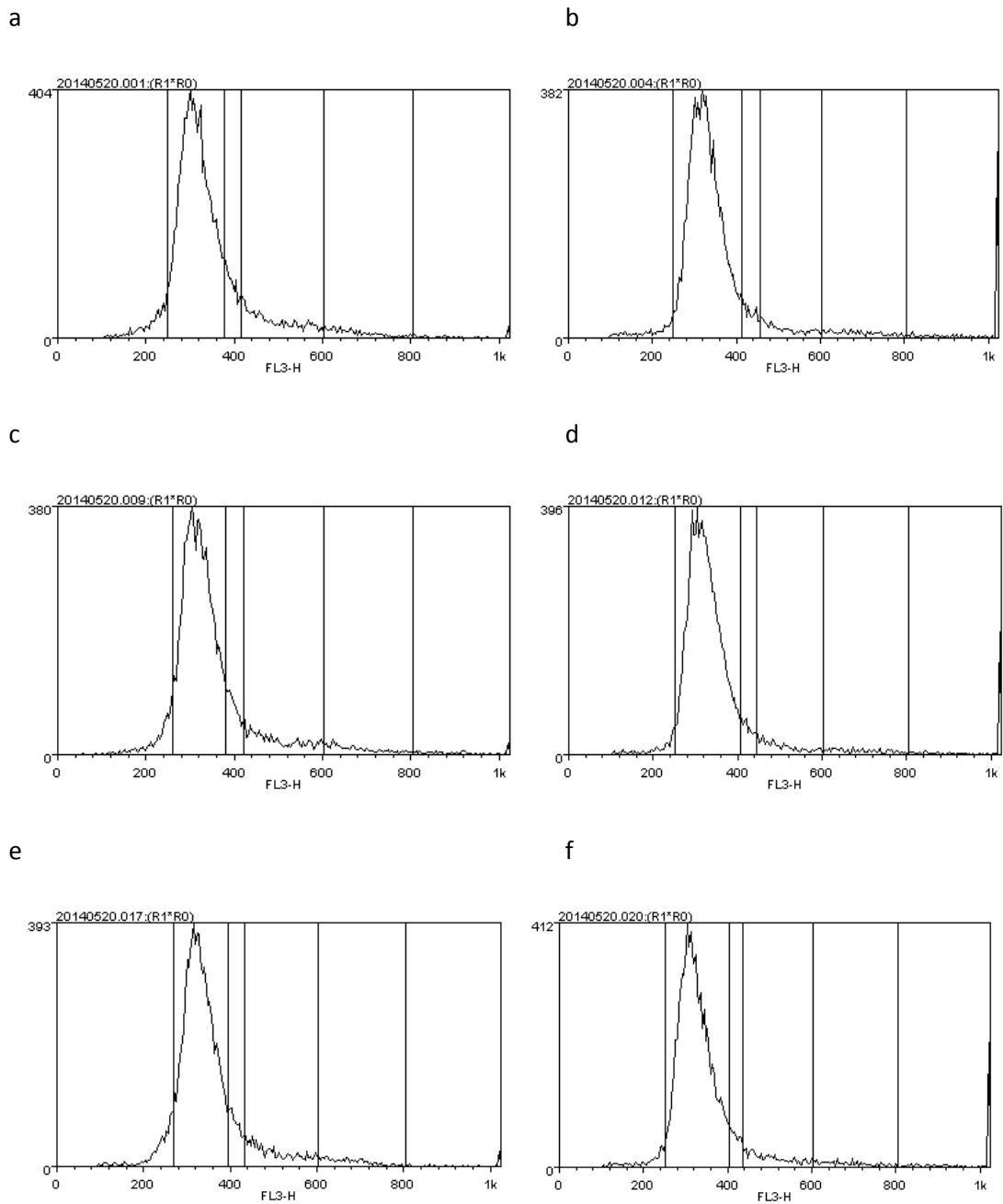


Figura 23 . Ejemplo de histogramas de FL3 correspondientes a muestras estándar de humano Los histogramas a, c y e corresponden al método de Antonucci et al., y los b, d y f al método de Lazaros et al. ,evaluados a 0 h (a, b), 2 h (c, d) y 4 h (e, f). Se puede observar que los cambios entre muestras son mínimos.

Tabla 7. Representación los datos de la especie humana que corresponden a la proporción de células encontrada en cada una de las regiones en las que se dividió el histograma de la fluorescencia del IP, para cada una de las técnicas y con los diferentes tiempos de incubación en la solución de tinción antes de las medidas en el citómetro. Los datos indican el valor medio y la desviación estándar (%).

Técnicas	Tiempos	Región 1	Región 2	Región3	Región 4	Región5	Región6
Antonucci et al.(2013)	0 horas	14,1±10,5	63±7,5	6,8±1,4	7,4±1,5	2±0,7	0,5±0,1
	2 horas	4,9±0,3	78,5±3,6	6,6±1,3	6,5±1,5	2,6±0,6	0,5±0,2
	4 horas	5,4±0,7	71,5±0,6	8,3±0,3	10,4±1,3	3,3±0,2	0,6±0,1
Lazaros et al. (2011)	0 horas	3,8±0,8	76,9±1,1	7±0,5	8,4±1	2,5±0,3	0,5±0,2
	2 horas	2,8±0,1	74,1±2,1	8,8±0,6	9,9±1,5	3±0,3	0,6±0,1
	4 horas	3,6±0,2	73,4±1,6	11,1±2	8,2±0,5	2,4±0,2	0,6±0,2

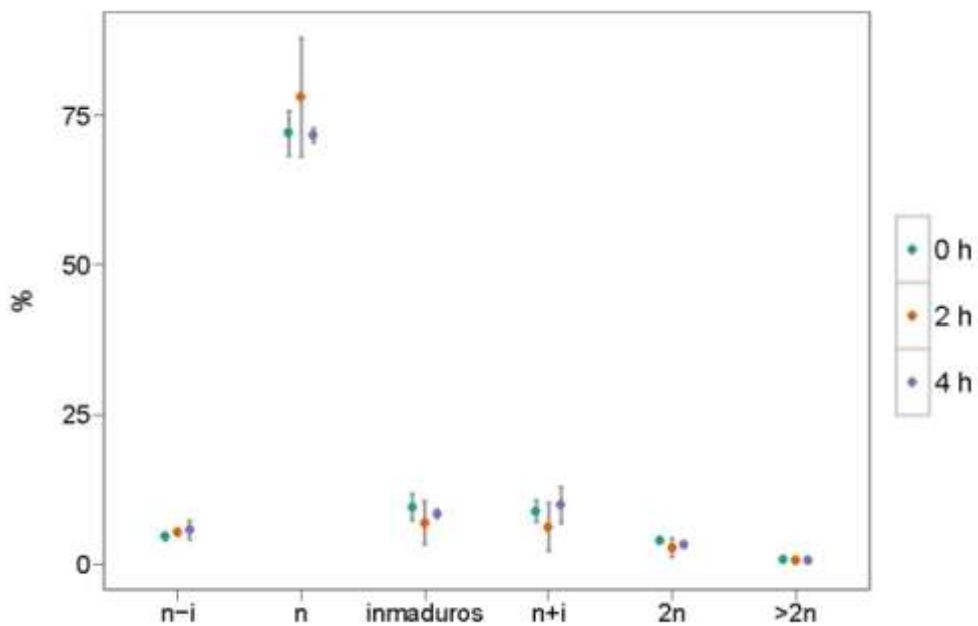


Figura 24 . Representación de los porcentajes existentes en cada región y en los distintos tiempos de incubación en la solución de tinción. Se representa la población humana mediante la técnica de Antonucci et al. (2013)

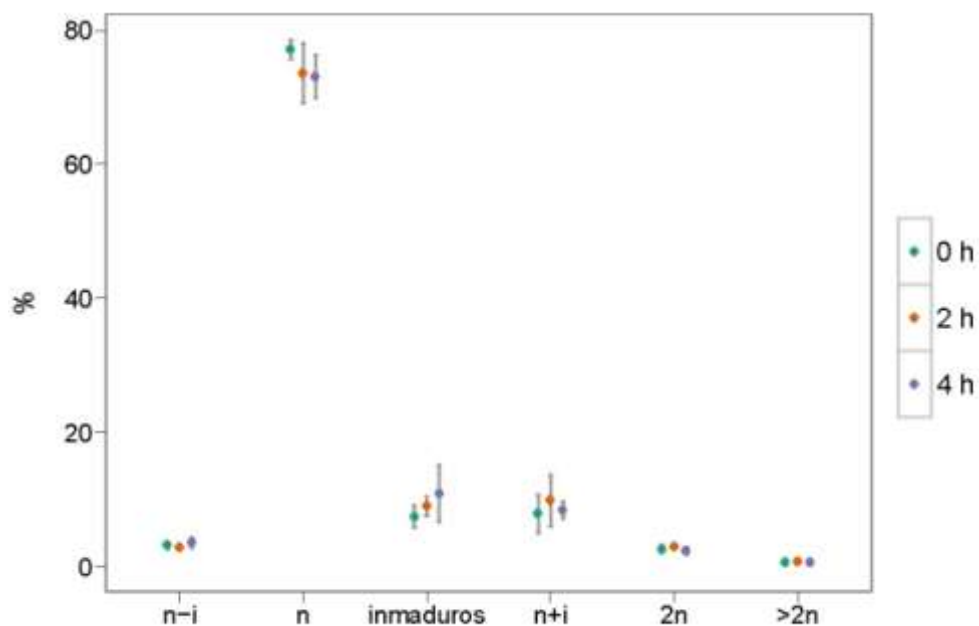


Figura 25 . Representación de los porcentajes existentes en cada región y en los distintos tiempos de incubación en la solución de tinción. Se representa la población humana mediante la técnica de Lazaros et al. (2011)

En cerdo se obtuvieron unos resultados similares en las tres medidas a diferentes tiempos. El pico de la población correspondió a las células que se encontraron en la región de los espermatozoides haploides maduros. Se obtuvo un pico más definido con la técnica de Antonucci et al. (2013) (Figura 26). Al pasar las horas, el pico se mantuvo en la misma posición, obteniéndose unos porcentajes muy parecidos, mediante el uso de las dos técnicas, en ambos tiempos (Tabla 8).

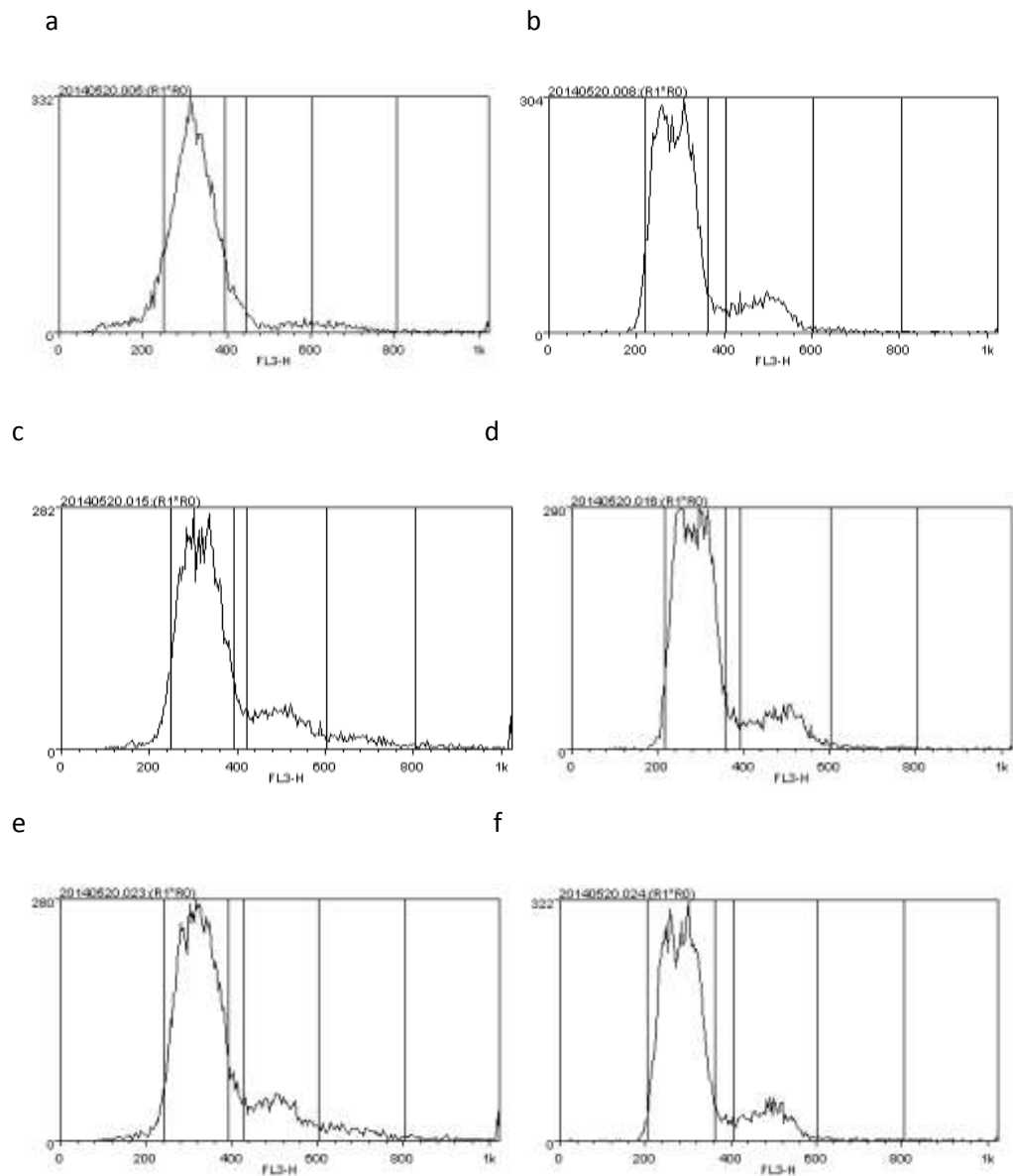


Figura 26. Ejemplo de histogramas de FL3 correspondientes a muestras estándar de cerdo. Los histogramas a, c y e corresponden al método de Antonucci et al., y los b, d y f al método de Lazaros et al., evaluados a 0 h (a, b), 2 h (c, d) y 4 h (e, f). Se puede observar que los cambios entre muestras son mínimos.

Tabla 8. Representación de la proporción de células encontrada en cada una de las regiones en las que se dividió el histograma de la fluorescencia del IP, para cada una de las técnicas y con los diferentes tiempos de incubación en la solución de tinción antes de las medidas en el citómetro. Los datos indican el valor medio y la desviación estándar (%). Los datos corresponden a la especie de cerdo

Técnicas	Tiempo	Región 1	Región 2	Región3	Región 4	Región5	Región6
Antonucci et al. (2013)	0 horas	6,2±1,2	67,3±2,3	8±0,8	12,7±2,4	4,4±0,8	1,1±0,4
	2 horas	7,9±1,3	66,9±2,5	8,1±0,5	11,9±2,2	4±0,4	0,9±0,3
	4 horas	11,3±3,1	66,5±3,7	6,9±0,3	10,6±1,9	3,6±0,3	0,8±0,1
Lazaros et al. (2011)	0 horas	2,4±0,7	71,1±2	6,5±0,6	15,5±1,1	3,4±1,8	0,8±0,3
	2 horas	3,2±0,4	71,4±2,1	5,9±0,8	15,8±0,8	2,5±0,5	0,9±0,3
	4 horas	3,8±0,4	70,7±2,9	6,2±0,9	14,8±0,8	2,8±0,7	1,2±0,4

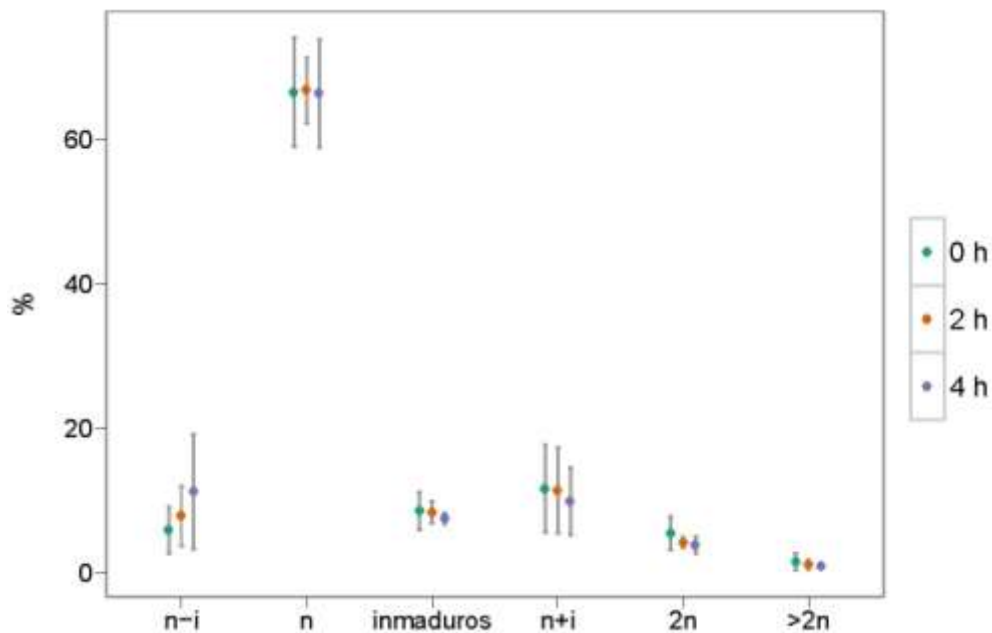


Figura 27. Representación de los porcentajes existentes en cada región y en los distintos tiempos de incubación en la solución de tinción. Se representa la población de cerdo mediante la técnica de Antonucci et al. (2013)

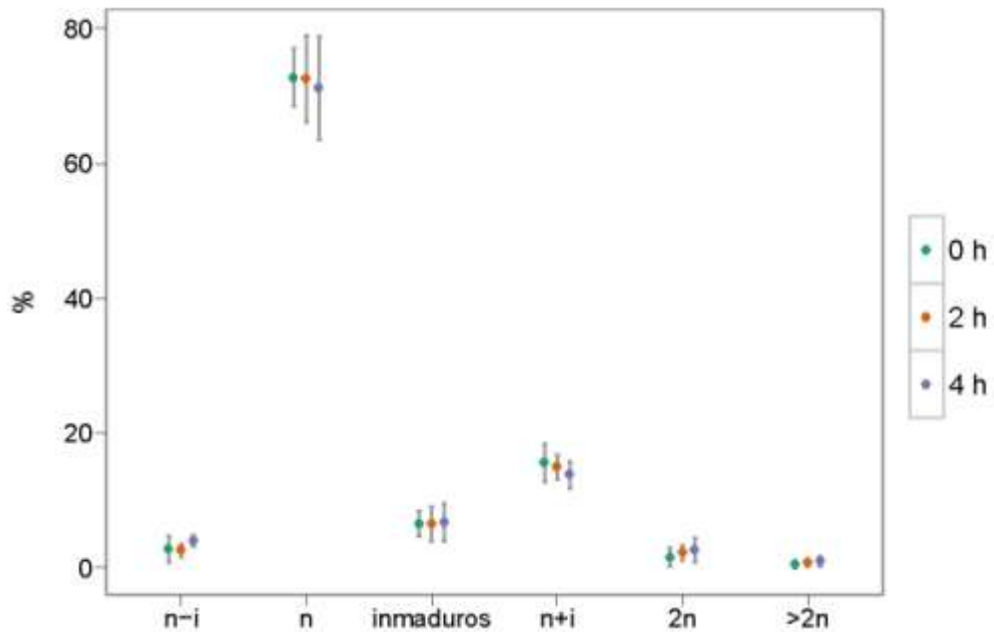


Figura 28. Representación de los porcentajes existentes en cada región y en los distintos tiempos de incubación en la solución de tinción. Se representa la población de cerdo mediante la técnica de Lazaros et al. (2011)

Un grupo de muestras procedentes de humano y cerdo utilizadas para la realización de los protocolos de Antonucci et al. y Lazaros et al. fueron analizadas a las 24 y 48 horas tras la tinción. En general, no observamos cambios importantes respecto a las lecturas del primer día. En cerdo, y con el protocolo de Antonucci et al., observamos una cierta pérdida de fluorescencia respecto al primer día., pero la estructura general del histograma se mantuvo y bastó un incremento en el voltaje de los fotodetectores para obtener resultados similares. En cambio, en humano, en ambos protocolos aunque más notable con el protocolo de Antonucci et al., detectamos un ligero incremento de la fluorescencia, con el pico principal desplazado hacia la derecha del histograma, lo cual se pudo corregir disminuyendo ligeramente el voltaje de FL3 durante la lectura.

Utilizamos el microscopio de fluorescencia para comprobar visualmente cambios en la fluorescencia o en el aspecto de las células. No se observaron cambios al respecto. De manera similar, otros parámetros obtenidos de los datos del citómetro (media, mediana o CV% de la fluorescencia de FL3) no variaron a lo largo del tiempo.

4.4 Experimento 3. Eliminación de la post-fijación en etanol.

En este experimento se modificaron los protocolos eliminando el paso de incubación en etanol. Realizamos este experimento intentando comprobar si en ausencia de etanol se sigue produciendo la pérdida de células que nos ocurría siguiendo todos los pasos detallados en los protocolos de Antonucci et al. y Lazaros et al. , tal y como detallamos en el experimento 1. Además, como en las muestras de cerdo se producía el fenómeno de aglutinación queremos comprobar si al introducir esta nueva variable, eliminando el paso de fijación, se sigue produciendo el agrupamiento de los espermatozoides.

Tanto en humano como en cerdo, se pudo comprobar que la velocidad de eventos que pasaban por el citómetro (eventos/segundo) mejoró considerablemente, debido a la menor pérdida de células durante los procedimientos. Los picos observados en el histograma quedaron más ajustados, aunque siguió observándose una diferencia entre las técnicas. En la técnica de Antonucci et al. se siguió obteniendo un el pico más estrecho y más definido que con la técnica de Lazaros et al. Los porcentajes de la población de haploides maduros se presentaron similares a los encontrados realizando el paso de fijación con etanol.

Respecto al fenómeno de aglutinación que ocurría en cerdo, observamos que este fenómeno y los artefactos asociados disminuyeron notablemente al eliminar el paso de incubación con etanol. Como resultado, en estas muestras de cerdo se perdieron menos células durante los últimos pasos del protocolo, resultando en una mayor velocidad de lectura y resultados más fiables.

Con este experimento intentamos establecer las posibles diferencias entre los protocolos con el paso de incubación, y aquellos en los cuales no existe este paso. Realizamos una tabla resumen de los parámetros de media, mediana y coeficiente de variación entre las distintas técnicas realizadas con y sin el paso de incubación en etanol. Humano (Tabla 9), cerdo (Tabla 10).

Tabla 9. Representación de la media, mediana y coeficiente de variación en la especie humana, relacionando las técnicas de Antonucci et al. y Lazaros et al. con y sin presencia del paso de fijación en etanol.

Técnica	Media	Mediana	Coeficiente de variación
Antonucci et al. con etanol	343±5,2	322,8±4,4	29,2±1
Antonucci et al. sin etanol	323,7±14,1	302,3±11,1	29,1±2,2
Lazaros et al. con etanol	335,4±23	311,3±21	29,7±0,3
Lazaros et al. sin etanol	337,9±9,4	309,5±8,3	35±1,2

Tabla 10. Representación de la media, mediana y coeficiente de variación para las especie de cerdo, relacionando las técnicas de Antonucci et al. y Lazaros et al. con y sin presencia del paso de fijación en etanol.

Técnicas	Media	Mediana	Coeficiente de variación
Antonucci et al. con etanol	335,1±16,1	302,8±16,2	38,2±1,4
Antonucci et al. sin etanol	311,8±3,4	295,3±5,8	24,6±6,7
Lazaros et al. con etanol	325±10,8	287,1±10,9	39,5±2,2
Lazaros et al. sin etanol	348,1±13,3	316,7±16,2	31,6±2,7

4.5 Experimento 4. Comparación de los valores obtenidos en las muestras mediante el análisis dos fotodetectores y dos citómetros distintos.

Todos los análisis se realizaron adquiriendo la fluorescencia naranja y roja de los eventos, con los fotodetectores, FL2 y FL3. No se observaron grandes diferencias entre el uso de uno u otro fotodetector ni en las muestras de humano (Tabla 11), ni en las de cerdo (Tabla 12). En ambos casos se obtuvo un histograma similar, en el que se pudieron obtener las mismas poblaciones.

Respecto al análisis con los dos citómetros, FACScalibur y CyAn ADP, en ambos casos encontramos resultados muy similares (Tabla 13). Las únicas diferencias consistieron en los distintos protocolos de ajuste y adquisición de muestras. Una vez realizados los ajustes correspondientes a FL2 y FL3, los histogramas nos devolvieron información muy parecida

Tabla 11 . Representación de valores de media, mediana y coeficiente de variación en las muestras humanas para los dos fotodetectores (FL2-H, FL3-H), con las diferentes técnicas y variando las condiciones de presencia o ausencia de etanol.

Técnica	Variables	Fotodetectores	Media	Mediana	Coeficiente de variación
Antonucci et al. (2013)	con etanol	FL2-H	296,8±20	268,8±23,9	38,5±8,2
		FL3-H	333,7±16,5	295,6±12,3	33±4,4
	sin etanol	FL2-H	321,5±3,8	301,5±3,1	29,7±0,9
		FL3-H	344±4,7	323,6±4,1	29,2±0,9
Lazaros et al. (2011)	con etanol	FL2-H	323,8±9,3	296,2±7,9	34,5±1,3
		FL3-H	337,9±9,4	309,5±8,3	35±1,2
	sin etanol	FL2-H	309,8±5,8	288,7±5,3	29,6±0,2
		FL3-H	335,4±23	311,3±21	29,7±0,3

Tabla 12 . Representación de valores de media, mediana y coeficiente de variación en las muestras de cerdo para los dos fotodetectores (FL2,FL3), con las diferentes técnicas y variando las condiciones de presencia o ausencia de etanol.

Técnica	Variables	Fotodetectores	Media	Mediana	Coeficiente de variación
Antonucci et al. (2013)	con etanol	FL2-H	324,4±9,4	293,7±9,7	37,4±1,2
		FL3-H	335,1±16,1	302,8±16,2	38,2±1,4
	sin etanol	FL2-H	326,3±13,5	308,7±5,3	24,9±6,7
		FL3-H	311,8±3,4	295,3±5,8	24,6±6,7
Lazaros et al. (2011)	con etanol	FL2-H	334,8±10,9	296,8±10	38,8±1,7
		FL3-H	325±10,8	287,1±10,9	39,5±2,2
	sin etanol	FL2-H	348,2±2,1	314±8,3	33,1±2,6
		FL3-H	348,1±13,3	316,7±16,2	31,6±2,7

Tabla 13. Representación de los datos obtenidos de media, mediana y coeficiente de variación en los dos citómetros utilizados (FACSCalibur y Cyan ADP), con los dos fotodetectores (FL2-H, FL3-H) y con las dos técnicas utilizadas (Antonucci et al. y Lazaros et al.). Los datos pertenecen a las muestras de humano.

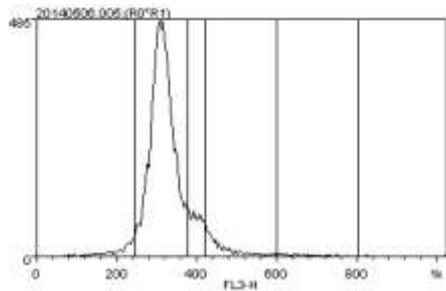
Técnica	Fotodetectores	Media		Mediana		Coeficiente de variación	
		FACS	CYAN	FACS	CYAN	FACS	CYAN
Antonucci et al. (2013)	FL2-H	312,5+7,3	233,1+14,2	290+8,5	222,4+13,4	32,6+2,8	26,8+1,7
	FL3-H	336,2+6	233,9,7+13,6	315,6+5	222,7+13,2	29,2+1	26,8+1,6
Lazaros et al. (2011)	FL2-H	321,2+7,7	176,4,8+7,8	294,8+6,4	163,8+9,0	33,6+1,1	31,2+1,9
	FL3-H	337,5+8,4	169,8+9,0	309,8+7,5	156,2+9,0	34,1+1,1	32,6+2

4.6 Experimento 5. Realización del análisis de muestras humanas procedentes de clínicas de reproducción sospechosas de alteraciones cromosómicas (candidatas a evaluación por FISH).

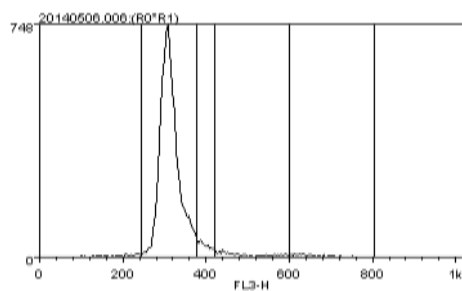
En este experimento llevamos a cabo el análisis de muestras humanas procedentes de clínicas de reproducción asistida: CREA Medicina de la Reproducción (Valencia), GINEFIV (Madrid) y del Hospital de Nuestra Señora de Fátima (Vigo). Se han analizado un total de 27 muestras. Estas muestras fueron enviadas a laboratorios especializados para analizar, mediante la técnica de FISH, el estudio de las aneuploidías. En el laboratorio del Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) se llevó a cabo el análisis de la fragmentación del ADN de dichas muestras mediante la técnica de SCSA. En este experimento se han utilizado estas muestras para analizar los porcentajes de aneuploidías, mediante la realización de la técnica de Antonucci et al. (2013). Se ha modificado el procedimiento general, eliminando de éste el paso de fijación de dos horas en etanol 70%. El análisis de las muestras mediante citometría de flujo se llevó a cabo con los citómetros FACSCalibur y CyAN ADP.

Mediante el software Weasel, se llevó a cabo la colocación de los marcadores basándose en las plantillas para la técnica de Antonucci et al. (2013) sin etanol de las muestras estándar de humano que se habían utilizado en los anteriores experimentos (Figura 29,30 y 31). Se calcularon los porcentajes de células correspondientes a cada región para cada muestra analizada (Tabla 14). Mediante la técnica de SCSA se llevó a cabo los análisis de la fragmentación del ADN de dichas muestras (Tabla 15). Además, las clínicas nos enviaron los resultados de las pruebas de FISH de algunas de las muestras (Tabla 16).

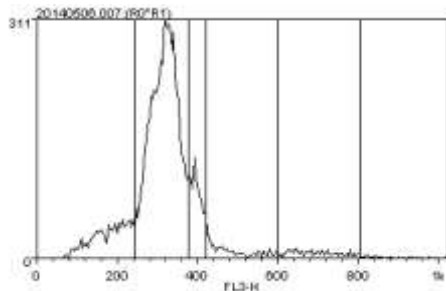
Muestra 1



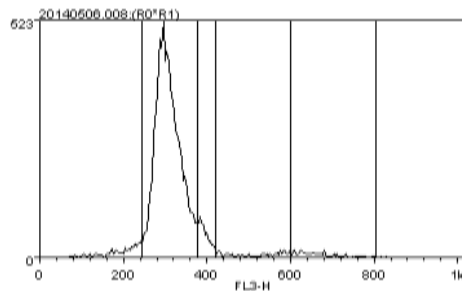
Muestra 2



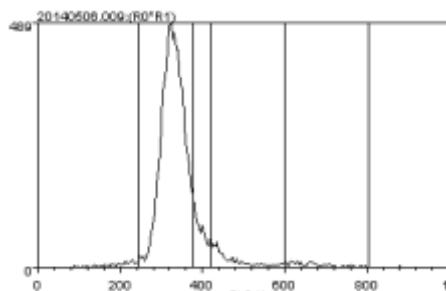
Muestra 3



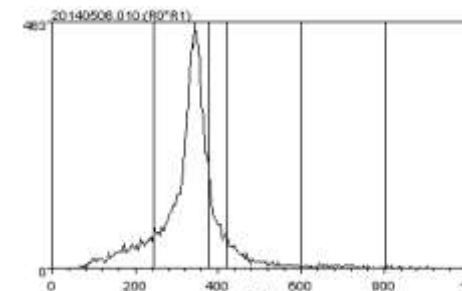
Muestra 4



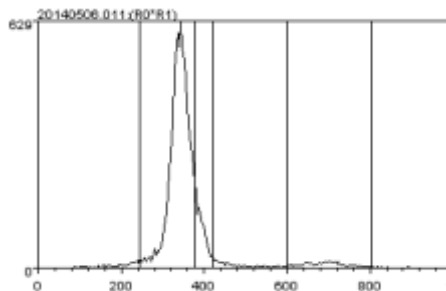
Muestra 5



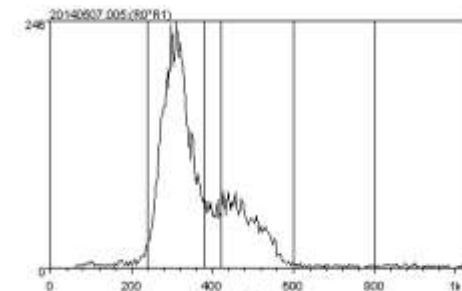
Muestra 6



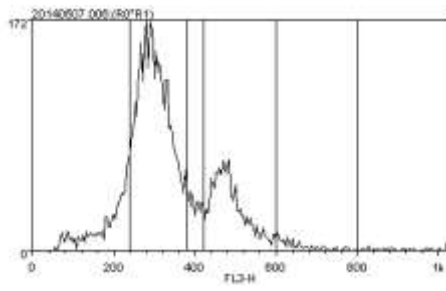
Muestra 7



Muestra 8



Muestra 9



Muestra 10

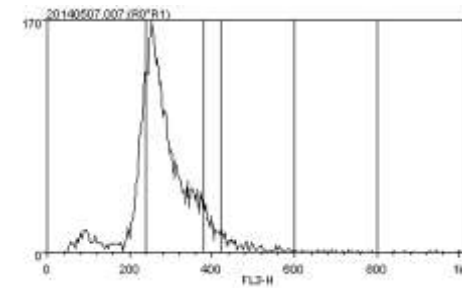
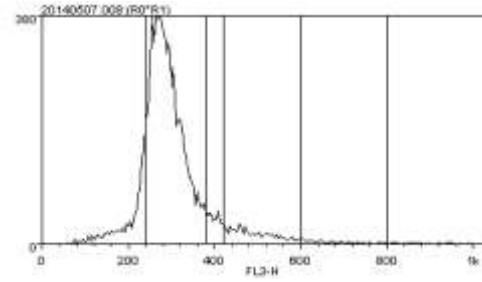
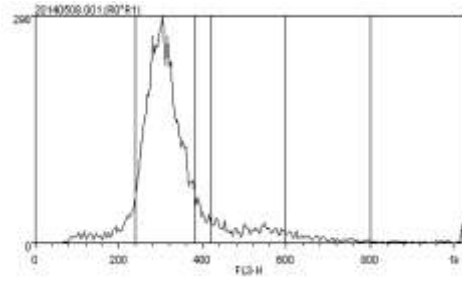


Figura 29. Histogramas de las muestras humanas enviadas para FISH procedentes de las clínicas de reproducción asistida.

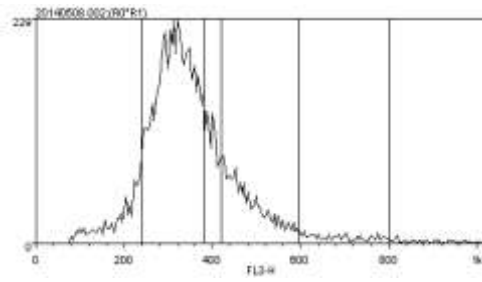
Muestra 11



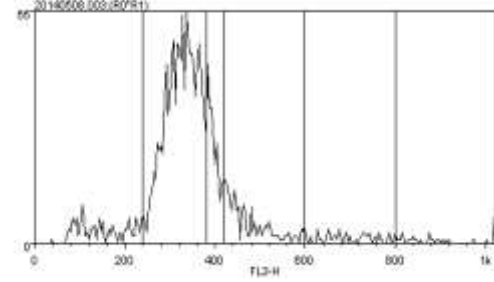
Muestra 12



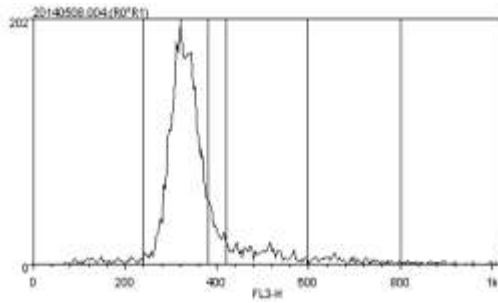
Muestra 13



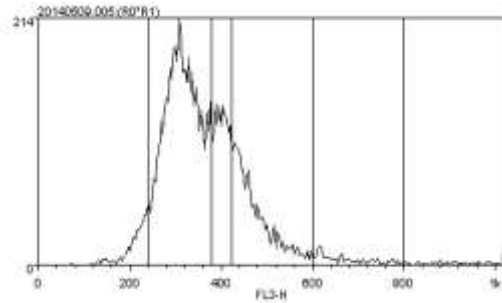
Muestra 14



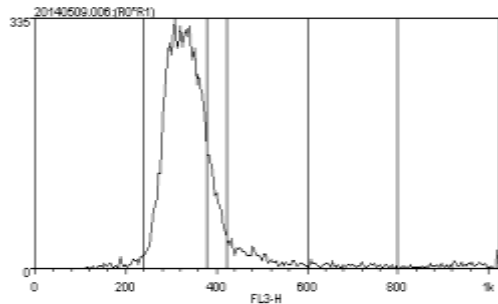
Muestra 15



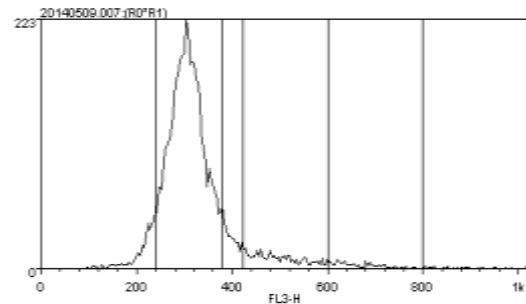
Muestra 16



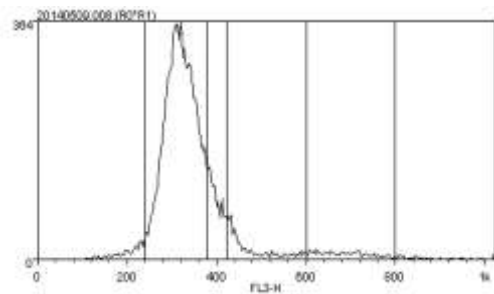
Muestra 17



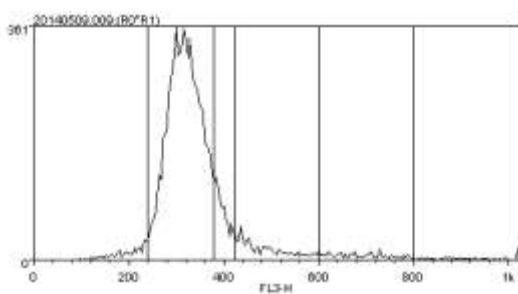
Muestra 18



Muestra 19



Muestra 20



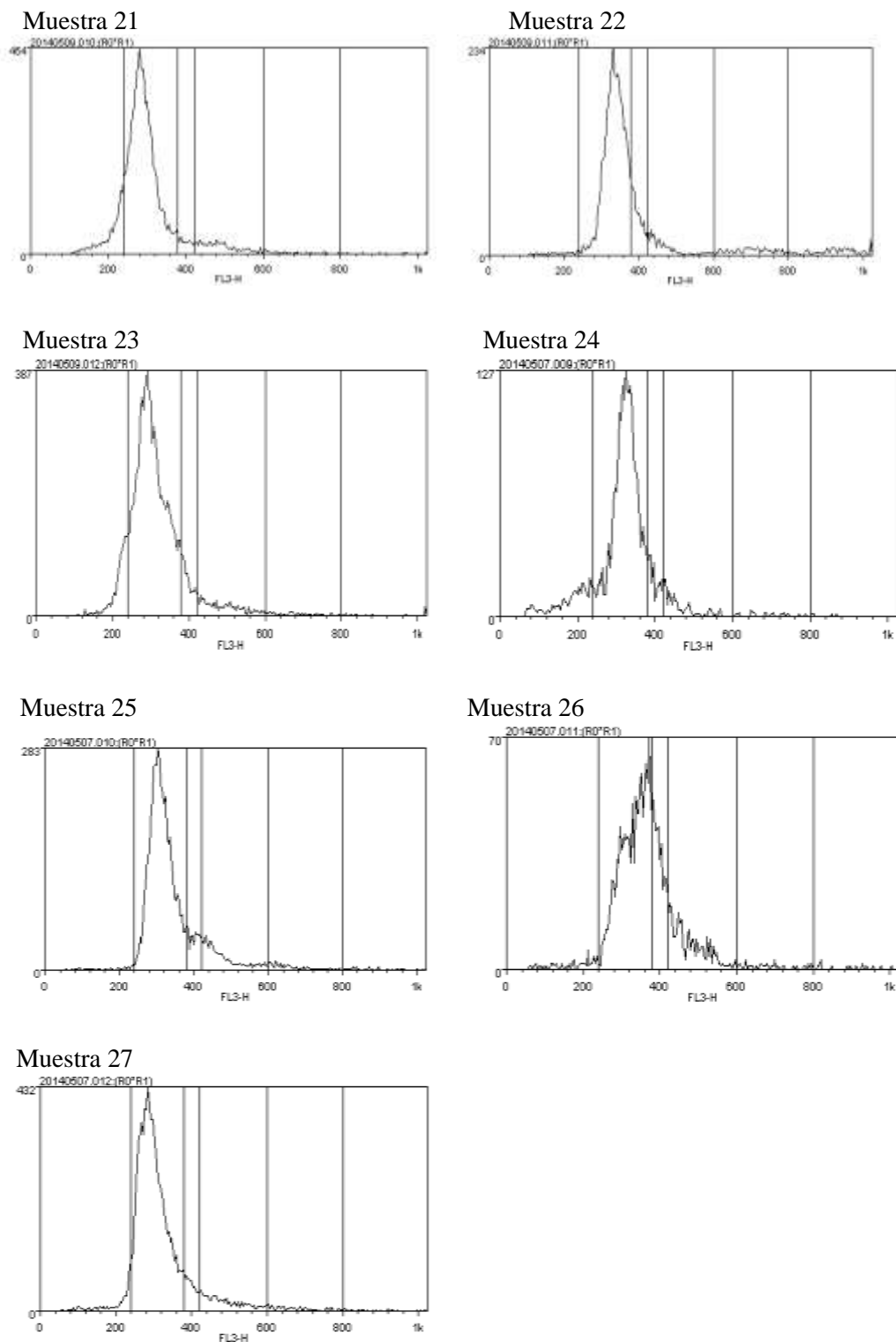


Figura 31. Histogramas de las muestras humanas enviadas para FISH procedentes de las clínicas de reproducción asistida.

Tabla 14. Representación del aspecto del histograma, de la proporción de células encontrada en cada una de las regiones en las que se dividió el histograma de la fluorescencia del IP para las muestras humanas del experimento 5, de los porcentajes obtenidos por medio de la técnica de SCSA. DFI representa el índice de fragmentación de ADN, HSD indica el porcentaje de células inmaduras. En la última columna se observa el resultado de FISH que obtuvieron las clínicas de estas muestras.

Identificación	Histograma	Región1	Región2	Región3	Región4	Región5	Región6	%DFI	%HSD	FISH
Muestra 01	Normal	5,05	76,86	10,83	5,97	1,12	0,15	23,24	4,61	Negativo
Muestra 02	Normal	1,7	87,6	5,78	3,28	1,63	0,01	23,21	3,63	Negativo
Muestra 03	Alterado	14,91	64,12	12,54	4,23	3,46	0,71	22,5	3,23	Negativo
Muestra 04	Normal	5,9	80,6	7,25	2,97	3,06	0,2	10,85	6,54	Negativo
Muestra 05	Normal	2,37	78,02	11,4	5,71	2,3	0,2	8,82	4,22	Negativo
Muestra 06	Alterado	20,71	66,31	7,02	3,76	1,76	0,4	41,43	4,95	Negativo
Muestra 07	Normal	4,82	84,2	4,7	1,39	4,45	0,37	17,45	2,56	Negativo
Muestra 08	Alterado	4,68	56,85	13,47	22,61	1,16	1,16	8,23	21,16	Positivo
Muestra 09	Alterado	17,6	49,47	9,38	20,51	2,28	0,67	28,78	12,67	Positivo
Muestra 10	Duda	8,75	66,41	14,3	8,96	0,99	0,5	17,57	5,5	Negativo
Muestra 11	Normal	5,62	73,51	9,15	9,39	1,7	0,63	23,68	5,7	Negativo
Muestra 12	Normal	8,94	66,57	9,26	10,79	3,46	0,7	39,46	7,1	Negativo
Muestra 13	Alterado	17,02	54,12	10,31	14,39	3	0,93	61,07	7,52	Negativo
Muestra 14	Alterado	11,17	65,21	10,56	7,97	3,39	1,37	8,58	11,94	Negativo
Muestra 15	Normal	3,65	77,91	5,43	8,37	3,33	0,82	16,92	3,38	Negativo
Muestra 16	Alterado	6,25	48,09	21,77	19,68	3,15	0,85	27,89	4,67	Negativo
Muestra 17	Normal	4,75	75,98	8,85	5,73	2,38	2,07	21,79	6,03	Negativo
Muestra 18	Duda	10,56	67,96	9,33	8,74	2,94	0,39	17	3,66	Negativo
Muestra 19	Normal	7,02	73,52	8,63	5,6	4,43	0,72	15,61	16,56	Negativo
Muestra 20	Normal	8,05	74,28	6,65	6,29	3,7	0,85	15,27	5,03	Negativo
Muestra 21	Normal	8,62	72,06	7,37	10,05	1,37	0,47	27,46	5,89	Negativo
Muestra 22	Normal	2,41	73,26	8,3	5,59	5,43	4,66	16,47	16,21	Negativo
Muestra 23	Alterado	13,46	68,82	8,33	7,31	1,54	0,4	-	-	Negativo
Muestra 24	Normal	10,56	71,19	8,25	7,72	1,86	0,39	32,18	2,66	Sin datos
Muestra 25	Normal	0,99	75,01	7,18	12,15	3,45	1,18	34,55	3,27	Sin datos
Muestra 26	Alterado	2,5	57,06	19,51	16,76	2,75	1,18	13,73	7,45	Sin datos
Muestra 27	Alterado	4,14	78,2	5,78	8,25	2,59	1,01	42,24	2,57	Sin datos

En los histogramas se puede observar como algunas de las muestras forma un patrón distinto a muestras normales. El pico de la población de espermatozoides haploides maduros sigue estando representado en la misma posición. Se compararon las proporciones obtenidas en cada región con los obtenidos en las muestras estándar de humano que se muestran en la tabla 5. En ella los porcentajes para cada zona son $6\pm 1,3$ para la región de nulisómicos (n-i), $69\pm 5,2$ para la población de células haploides (n) maduras, $7,9\pm 0,9$ para la pequeña región que comprende a la células haploides inmaduras, $8,1\pm 1,7$ para los disómicos (n+i), $2,8\pm 1$ para los diploides (2n) y $0,8\pm 0,3$ para los poliploides ($>2n$). Comparando estos datos con la tabla que indica los valores obtenidos para este tipo de muestras, vemos que muchas de ellas presentan anomalías en las proporciones por zonas.

Los histogramas alterados aparecen en las muestras que se detallan en la tabla 14. En las muestras 5,6,8,15,25,26 y 27 se encuentran anomalías respecto a las proporciones de células de cada región. En la muestra 15 se puede ver un alto porcentaje de poliploides. Respecto a las pruebas de fragmentación, se consideran muestras problemáticas aquellas que superen el 30% del DFI, y el 15% del HSD. En las 27 muestras, superan el 30% de DFI las muestras 6, 9,12,13,16,24,25 y 27. Y el 15% del HSD es superado por la muestra 8. En este caso, este valor de células inmaduras se puede relacionar positivamente con el alto porcentaje de éstas que presentan mediante el análisis de aneuploidías.

No se han podido obtener todos los resultados de las pruebas de FISH realizadas por las clínicas. Las muestras que han resultado positivas para esta prueba son la muestra 6 y la muestra 8.

La muestra 6 presentó proporciones elevadas de células en algunas regiones, así como un elevado índice de fragmentación. Por otro lado, la muestra 8 presentó una anomalía en el histograma con su correspondiente alteración de las proporciones de células en las regiones de células disómicas (n+i) y haploides inmaduras. Esto se confirma con un elevado porcentaje de HSD obtenido mediante la técnica de SCSA.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson, que mide el grado de covariación entre distintas variables

relacionadas linealmente. En este caso se han relacionado los distintos parámetros de fragmentación obtenidos por la técnica de SCSA (%DFI y %HSD) con los porcentajes de células presentes en las regiones (presencia de aneuploidías). No se han encontrado correlaciones entre la fragmentación y las aneuploidías salvo en la región 3. En esta región existe una correlación entre aneuploidías y el porcentaje de HSD, obteniéndose una correlación por encima de cero de 0,4150233 y un p-valor de 0.03501. Esto es importante, porque HSD representa el porcentaje de células inmaduras y se han descrito en esta región esa misma población.

5. DISCUSION

En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la detección de aneuploidías espermáticas, mediante citometría de flujo, siguiendo los protocolos descritos por Antonucci et al.(2013) y Lazaros et al. (2011). Algunos autores han propuesto la detección de las aneuploidías utilizando la citometría de flujo (Lazaros et al. 2013, Lazaros et al.2011a, Lazaros et al. 2011b, Antonucci et al. 2013, Hacker Klom et al.1999, Giwercman et al.1988, Levek Motola et al.2005, Yeung et al.2007, Koscinski et al.2005) o combinándolo con la técnica de FISH (Durakbasi-Dursun et al. 2008 ; Zhou et al.2011 ; Kovacs et al. 2008, Weissenberg et al.1988).

Como se detalló en nuestro experimento 1, llevamos a cabo las técnicas detalladas en los protocolos de Lazaros et al. (2011) y Antonucci et al. 2012 para muestras de humano y cerdo. Las muestras utilizadas fueron muestras estándar de cerdo y humano, en las que no esperábamos encontrar problemas. Las que fueron analizadas mediante la técnica de Lazaros et al. (2011) mostraron unos resultados de un $6,1\% \pm 1,5$ de células con falta de ADN ($n-i$), un pico con $69,1\% \pm 3,5$ de células haploides maduras (n), $9,7\% \pm 1$ de células haploides inmaduras, $10,4\% \pm 1,2$ de células con exceso de ADN ($n+i$), $3,2\% \pm 0,6$ diploides ($2n$) y un $0,9\% \pm 0,3$ presuntamente con hiperploidías ($n > 2n$). Estos resultados podemos compararlos con los obtenidos por Lazaros et al. (2011), que obtuvo unas frecuencia de ploidías de $4,4\%$ de ($n-i$), un pico de $72,8\%$ de células haploides maduras, $12,7\%$ de haploides inmaduras, $6,3\%$ de células ($n+i$), $3,9\%$ de células diploides y $1,9\%$ de tetraploides. Existen algunas dudas respecto al artículo publicado por Lazaros et al.(2011), ya que en éste se tratan mujeres que con problemas de endometriosis que han sufrido varios episodios de fallos de FIV. De los varones no se comenta ninguna causa de fallo. Con ello asumimos que son una población normal, con lo cual la comparación puede ser posible. En cambio, Antonucci et al. (2012) no hace referencia a la poblaciones obtenidas en las distintas regiones de los histogramas, por lo que no podemos realizar una comparación directa. Los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron similares. En este primer experimento concluimos que tuvimos éxito ya que conseguimos detectar la población de espermatozoides haploides maduros con una proporción similar y con una estructura del histograma parecida. Respecto a las

muestras de humano, podríamos realizar una comparación de la técnica de Lazaros et al. con la técnica descrita por Zhou et al. (2011). En el protocolo de Zhou et al. no se indica el tiempo de fijación en etanol, aunque la incubación con la tinción ocurre a 4 °C mientras que en nuestro trabajo la hemos realizado a temperatura ambiente como menciona el protocolo de Lazaros et al. Los porcentajes resultantes en unos varones de fertilidad probada mediante la técnica de Zhou et al. son $93,37\% \pm 5,41$ de haploides maduros y un $3,22\% \pm 1,81$ de haploides inmaduros. Estos porcentajes de haploides maduros son más elevados que los que se presentan con nuestra técnica, aunque esto podría ser debido a un análisis distinto del histograma, ya que las muestras problemáticas resultaron en casi un 90% de células consideradas haploides maduras.

En el caso de las muestras de cerdo, existe una ligera disminución del porcentaje de células del pico en la técnica de Antonucci et al. ($62,2\% \pm 2,45$), con respecto a la técnica de Lazaros et al. ($67,3\% \pm 2,3$). Esto lo atribuimos a los fenómenos de aglutinación que sucedieron en estas muestras, ya que se formaron aglomerados de espermatozoide que no se pudieron clasificar respondiendo al tipo de células que eran.

Si comparamos los porcentajes de células haploides maduras de la técnica de Antonucci et al., elaboradas con (experimento 1) y sin el paso con etanol (experimento 3), comprobamos que el porcentaje del pico se eleva en las muestras sin etanol, dejándolo más definido aún. Estos resultados se producen tanto en la especie cerdo como la humana, aunque el aumento es más notorio en las muestras de cerdo, donde el pico se eleva de un $62,2\% \pm 2,4$ en la técnica de Antonucci et al. con etanol, a un $83,1\% \pm 9,9$ en la misma técnica sin presencia de etanol. Es conveniente mencionar que en cerdo esto se puede ver relacionar con el incremento de las células cercanas a la población haploide maduros (n) en el protocolo de Antonucci et al. con etanol. Consecuentemente, encontramos una disminución de las células caracterizadas como nulisómicas (n-i), inmaduras y disómicas (n+i) en las muestras tratadas con etanol. Este efecto también se puede comprobar, aunque en menor medida, en las muestras de cerdo que siguieron el protocolo de Lazaros et al. y en las muestras de humano de ambos procedimientos.

Por lo tanto, es claro que el paso de fijación con etanol causó una disminución de las células analizadas, prolongaba el protocolo tanto en su preparación como en su

análisis la disminución del porcentaje de células que componen el pico principal y el aumento de otras poblaciones mal clasificadas. Debido a que este paso no parecía ser fundamental para la tinción ni para la estabilidad de ésta, concluimos que puede ser excluido sin consecuencias, e incluso que esto sería adecuado para la correcta realización del procedimiento, sobre todo en cerdo. En las muestras de cerdo encontramos una incidencia importante de la aglutinación de los espermatozoides, que discutiremos más adelante en referencia a nuestro Experimento 3.

Con el fin de optimizar ambas técnicas se llevó a cabo el estudio de éstas alterando varios parámetros. En el Experimento 2, se estudiaron diversos tiempos de tinción, ya que en determinadas ocasiones sería conveniente retrasar la evaluación de las muestras por citometría de flujo (por ejemplo, si el aparato no está disponible al finalizar la tinción). Nuestros resultados nos permiten concluir que el tiempo no es una variable que altere los resultados, al menos si respetamos la conservación refrigerada y en oscuridad, obteniéndose los mismos resultados que al analizar justo después de finalizar el protocolo de tinción. Se esperaba que la fluorescencia fuese disminuyendo al aumentar el tiempo de exposición, mostrando menores resultados al análisis mediante citometría de flujo, pero al estudiar los histogramas a distintos tiempos (incluso tras 1 y 2 días) solo detectamos leves cambios en ésta. Este fenómeno ocurre en las dos técnicas y con los dos protocolos, aunque es más acusado en las muestras de cerdo, donde el pico mediante la técnica de Antonucci et. al disminuyó levemente a las 4 horas. No obstante, esta alteración fue fácilmente corregida en todos los casos y no alteró el análisis de las muestras.

El fenómeno de aglutinación que ocurría en cerdo llevando a cabo los protocolos descritos, producía una disminución del número de células, posiblemente tanto por pérdida en los lavados de la técnica como por formar eventos con valores de FSC, SSC o FL-3 anómalos, que eran descartados durante el análisis. Esto resultaba en una menor cantidad de células analizadas. La disminución de células ocurría también en humano, posiblemente no tanto por aglutinación como porque el paso por etanol causaba una mayor pérdida de células en los pasos de lavado.

No existen diferencias notorias respecto al uso de distintos citómetros para la toma de muestras. En el experimento 4 llevamos a cabo un doble análisis de las

muestras en el citómetro de flujo FACSCalibur y CyAn ADP. Esto es una clara evidencia de las posibilidades que tiene la técnica para poderse replicar en distintos laboratorios, independientemente del tipo de citómetro de flujo del cual se disponga.

En el mismo sentido, tampoco encontramos diferencias evidentes entre los resultados obtenidos por los fotodetectores del naranja y del rojo. Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a una longitud de onda superior. No obstante, los espectros de excitación y de emisión no se limitan a una única longitud de onda, sino que configuran un rango a veces bastante amplios. Su utilización está condicionada al tipo de láser del citómetro y a los fotodetectores disponibles, que deben estar dentro de estos rangos de excitación y emisión, respectivamente. En nuestro caso utilizamos el IP, que se excita a 536 nm (verde) y emite a 617 nm (naranja), pero que puede excitarse con luz en el ultravioleta y desde azul hasta el verde, y que emite desde el amarillo hasta el rojo lejano. En nuestros citómetros no se disponía de un láser que excitara para el verde, utilizando el láser de 488 nm (azul), que, aunque no es el óptimo tiene suficiente potencia para conseguir una buena excitación. La emisión fue recogida por los fotodetectores FL2 y FL3 que fueron los que mejor se adaptaban a las condiciones que presentamos (el CyAn ADP cuenta con otros dos fotodetectores de rojo, que no fueron utilizados para contar con una configuración similar en ambos citómetros). Existen citómetros de flujo que presentan láser verde, como por ejemplo LSRFortessa SORP (BD Biociencias), y que tal vez podrían mejorar el análisis de las muestras. La ampliación de este trabajo utilizando distintos láser es una opción abierta para un estudio futuro (Givan, 2004; Hawley and Hawley, 2004).

El Experimento 5 es un ejemplo de aplicación práctica del protocolo optimizado (Antonucci et al., sin paso por etanol), dado que se solicitó a varias clínicas que proporcionasen muestras que habían sido enviadas también para evaluación por FISH. Dado que eran sospechosas para anomalías cromosómicas, estimamos que al menos parte de ellas deberían proporcionar un histograma con un perfil muy diferente, permitiendo identificar estas anomalías. En los resultados pudimos detectar cierta variabilidad en cuestión de pacientes, aunque la mayor parte no encontramos un perfil anómalo, coincidiendo con los informes de las clínicas. No obstante, en algunas

muestras identificamos un alto porcentaje de células fuera del pico principal, bien en la zona $n-i$, en la zona de células inmaduras o $n+i$, e incluso en $2n$. Como se ha mostrado en los resultados, dos de estas muestras anómalas han coincidido con los resultados de FISH realizados sobre los cromosomas sexuales. Hay que destacar que otra muestra, reportada como negativa para FISH en los cromosomas sexuales, resultó en un histograma anómalo. Esto permite resaltar una de las ventajas de nuestro análisis, ya que, aunque no podemos especificar el tipo de anomalía concreto ni los cromosomas implicados, sí que permite realizar una evaluación global del cariotipo, lo cual sería caro o complicado en el caso de la utilización de FISH u otras técnicas.

Hasta ahora, la incapacidad para evaluar todo el complemento cromosómico es la principal limitación de los estudios destinados a evaluar las anomalías cromosómicas numéricas en muestras de esperma. Como resultado de ello, algunos de los espermatozoides clasificados como “cromosómica normales” pueden ser aneuploides para los cromosomas que no se probaron.

Existen estudios que relacionan la presencia de aneuploidías en espermatozoides inmaduros (Morel et al., 1998; Kovanzi et al., 2001; Moretti et al., 2009; Ovari et al., 2010) y fragmentación de ADN (Muriel et al., 2007; Tang et al., 2010). Estudios relacionando la técnica de dispersión de la cromatina y pruebas de FISH en unos pocos cromosomas, compararon la fragmentación de la ADN del espermatozoide mediante la prueba de dispersión de la cromatina (SCD). Observaron que la tasa de aneuploidía aumentaba a medida que aumentaba la fragmentación de ADN (Muriel et al. 2007). Por otro lado, algunos autores relación el nivel de fragmentación, la tasa de aneuploidía y la morfología propia de los espermatozoides. En varones teratozoospermicos el porcentaje de fragmentación del ADN, analizado mediante la técnica del TUNEL, y la tasa de aneuploidías presentan unos niveles mayores en relación a un grupo normal. Además la morfología anormal puede estar correlacionada con la fragmentación y las aneuploidías (Tang et al. 2010). Existen diversas opiniones al respecto de si existe o no una relación entre el grado de fragmentación y la tasa de aneuploidía. Algunos autores han demostrado esta relación (Enciso et al. 2013, Muriel et al.2007, Schmid et al. 2003). Otros, en cambio, afirman que no existe esta relación (Balasuriya et al. 2011, Bornet et al. 2012). La correlación existente entre la proporción de espermatozoides que presentan

anomalías cromosómicas numéricas y el nivel de fragmentación fue observado tanto en pacientes con el cariotipo alterado como en pacientes con tasas de anomalías cromosómicas dentro del rango normal (Enciso et al. 2013).

Las muestras de humano procedentes de las clínicas que fueron sometidas a las pruebas de FISH y a nuestra técnica de Antonucci et al. sin el paso de etanol, fueron utilizadas para realizar el análisis de la fragmentación mediante SCSA. En este caso, se considerarían unos resultados preocupantes cuando aparece más de un 30% del índice de fragmentación (DFI), si se presenta un alto porcentaje de células inmaduras (HDS) (por encima del 15%). Algunas de las muestras presentaban unos porcentajes de DFI superiores al 30%, presentando además unas proporciones elevadas de las tasas de aneuploidías. Respecto a los casos que presentaban un alto porcentaje de HDS, también presentaban una alta tasa de células inmaduras y disómicas (n+i). Todos los datos se relacionaron con los obtenidos de las pruebas de FISH, intentando obtener una correlación entre valores de FISH positivos y una alta tasa de fragmentación. Al realizar el análisis estadístico entre los porcentajes de DFI y HSD con las distintas regiones, se observó que solo existen correlaciones significativas en la región 3. Esto presenta un punto muy interesante, sobre todo por HSD que mide el grado de inmadurez y en la región 3 es donde se situaron a las células inmaduras. En general, las correlaciones son bajas, y para DFI es negativa. Esto puede ocurrir ya que los valores de HSD y DFI no suelen coincidir. Se puede concluir que no existe una correlación entre el grado de fragmentación y las aneuploidías presentes. A pesar de ello, no podemos concluir mucho con estas muestras, ya que alguna de ellas presenta una fragmentación muy alta y un histograma normal. .

A través de pruebas estadísticas sencillas se puede conocer si la incidencia de las aneuploidías en una muestra de espermatozoides difiere de la observada en una población normal. La prueba de FISH para espermatozoides aplicada como una herramienta diagnóstica puede seguir avanzando, y ofrecer al clínico un valor pronóstico de la situación del paciente con el fin de poder evaluar las posibilidades reproductivas de la pareja infértil. Ante resultados positivos de FISH, considerando esto como fuera del rango normal, hay que tener en cuenta la evaluación de varios términos. Si afecta o no, y cómo a los resultados clínicos, las diferentes consecuencias clínicas en

función de las anomalías observadas y el grado en que afectan, así como las posibles alternativas de tratamiento que se le pueden ofrecer a la pareja para mejorar las posibilidades de éxito reproductivo.

6. CONCLUSIONES

Como resultado de este trabajo, podemos exponer las siguientes conclusiones:

- Las técnicas descritas por Antonucci et al. y Lazaros et al. son procedimientos adecuados para la detección de anomalías cromosómicas en espermatozoides, mediante citometría de flujo

- Tiempos de incubación mayores a 2 horas no ven alterados los resultados obtenidos.

- La eliminación del etanol de ambas técnicas, simplifica el procedimiento y no afecta a los resultados.

- Este tipo de técnicas son reproducibles en distintos laboratorios, bien utilizando diferentes citómetros o contando con una amplia variedad de láser de excitación adecuados al fluorocromo que utilizamos.

- La técnica de Antonucci et al., independientemente de la modificación, parece ser una técnica válida para evaluar aneuploidías mediante citometría de flujo y puede ser una técnica complementaria a FISH (para hacer cribado previo al menos).

- En la clínica humana, se puede complementar a las pruebas de análisis básico y fragmentación (SCSA), adquiriendo una mayor información y pudiendo escoger con más acierto la TRA más adecuada a cada caso.

- Esta técnica en su uso en la investigación animal, puede ayudar a evitar pérdidas económicas al poder elegir con más exactitud los machos con menor número de alteraciones, complementando así las pruebas de fragmentación, y no disminuyendo el número de crías por camada.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, A., and Allamaneni, S.S.R. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol.* 56, 235–245.

Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al.* 1994. *Biología Molecular de La Célula* (2ª ed.). Barcelona: Ediciones Omega, S.A, pp. 895-936.

Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., and Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reprod. Camb. Engl.* 146, R163–174.

Antonucci, N., Manes, S., Corradetti, B., Manicardi, G.C., Borini, A., and Bizzaro, D. (2013). A novel in vitro sperm head decondensation protocol for rapid flow cytometric measurement of deoxyribonucleic acid content. *Fertil. Steril.* 99, 1857–1861.

Balasuriya, A., Speyer, B., Serhal, P., Doshi, A., and Harper, J.C. (2011). Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online*

Bellver, J., Ayllón, Y., Ferrando, M., Melo, M., Goyri, E., Pellicer, A., Remohí, J., and Meseguer, M. (2010). Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil. Steril.* 93, 447–454.

Bernardini, L.M., Costa, M., Bottazzi, C., Gianaroli, L., Magli, M.C., Venturini, P.L., Francioso, R., Conte, N., and Ragni, N. (2004). Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reprod. Biomed. Online* 9, 312–320.

Bernardini, L.M., Calogero, A.E., Bottazzi, C., Lanteri, S., Venturini, P.L., Burrello, N., De Palma, A., Conte, N., and Ragni, N. (2005). Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients. *Int. J. Androl.* 28, 328–336.

Björndahl, L., Kjellberg, S., Roomans, G.M., and Kvist, U. (1986). The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *Int. J. Androl.* 9, 77–80.

Bonanni, G., Calcagno, A., Mammana, G., Chemello, E., Pennelli, N., and Mastrogiacomo, I. (1997). DNA flow cytometry of left and right testes in normospermic patients affected by left varicocele. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 12, 64–67.

Bonduelle, M., Aytoz, A., Van Assche, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (1998). Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 13, 781–782.

Bonduelle, M., Van Assche, E., Joris, H., Keymolen, K., Devroey, P., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. (2002). Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 2600–2614.

Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., and Kopelman, S. (2003). Infertility: causes and definitions. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 54, 227–248.

Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JM. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 2009; 10:207-216.

Burrello, N., Arcidiacono, G., Vicari, E., Asero, P., Di Benedetto, D., De Palma, A., Romeo, R., D'Agata, R., and Calogero, A.E. (2004). Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 19, 2298–2302.

Carrell, D.T. (2008). The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises. *J. Androl.* 29, 124–133.

Chan, S.L., Lipshultz, L.I., and Schwartzenrubner, D. (1984). Deoxyribonucleic acid (DNA) flow cytometry: a new modality for quantitative analysis of testicular biopsies. *Fertil. Steril.* 41, 485–487.

Collodel, G., and Moretti, E. (2006). Sperm morphology and aneuploidies: defects of supposed genetic origin. *Andrologia* 38, 208–215.

Collodel, G., and Moretti, E. (2008). Morphology and meiotic segregation in spermatozoa from men of proven fertility. *J. Androl.* 29, 106–114.

Coskun, S., Tbakhi, A., Jaroudi, K.A., Uzumcu, M., Merdad, T.A., and Al-Hussein, K.A. (2002). Flow cytometric ploidy analysis of testicular biopsies from sperm-negative wet preparations. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 977–983.

Dadoune, J.-P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res. Tech.* 61, 56–75.

Ducos, A., Berland, H., Pinton, A., Seguela, A., Brun-Baronnat, C., Darre, A. y Darre, R. (2000). Contrôle chromosomique des populations animales d'élevage. *INRA Productions Animales* 12(1):25-25.

Durakbasi-Dursun, H.G., Zamani, A.G., Kutlu, R., Görkemli, H., Bahce, M., and Acar, A. (2008). A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoastheno-teratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil. Steril.* 89, 1709–1717.

Eaker, S., Pyle, A., Cobb, J., and Handel, M.A. (2001). Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J. Cell Sci.* 114, 2953–2965.

Evenson, D.P. (1999). Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod. Fertil. Dev.* 11, 1–15.

- Evenson, D.P. (2013a). Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 927, 147–164.
- Evenson, D.P. (2013b). Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 927, 147–164.
- Evenson, D.P., and Melamed, M.R. (1983). Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 31, 248–253.
- Egozcue, J., Templado, C., Vidal, F., Navarro, J., Morer-Fargas, F., and Marina, S. (1983). Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum. Genet.* 65, 185–188.
- Enciso, M., Alfarawati, S., and Wells, D. (2013). Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum. Reprod.* 28, 1707–1715.
- Gil-Salom M, Bellver J, Romero JL, *et al.* 2002. Espermatogénesis: conceptos básicos. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J (Eds.) *Reproducción Humana*. 2ª Edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., pp. 273-278. ISBN: 84-486-0462-8.
- Giorlandino, C., Calugi, G., Iaconianni, L., Santoro, M.L., and Lippa, A. (1998). Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertil. Steril.* 70, 576–577.
- Givan, A.L. (2004). *Flow Cytometry: First Principles* (John Wiley & Sons).
- Giwercman, A., Clausen, O.P., and Skakkebaek, N.E. (1988). Carcinoma in situ of the testis: aneuploid cells in semen. *Br. Med. J. Clin. Res.* Ed 296, 1762–1764.
- Golan, R., Shochat, L., Weissenberg, R., Soffer, Y., Marcus, Z., Oschry, Y., and Lewin, L.M. (1997). Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 47–54.
- Guttenbach, M., Engel, W., and Schmid, M. (1997). Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. *Hum. Genet.* 100, 1–21.
- Hacker-Klom, U.B., Göhde, W., Nieschlag, E., and Behre, H.M. (1999). DNA flow cytometry of human semen. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 14, 2506–2512.
- Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat. Rev. Genet.* 11, 124–136.
- Al-Hassan, S., Hellani, A., Al-Shahrani, A., Al-Deery, M., Jaroudi, K., and Coskun, S. (2005). Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch. Androl.* 51, 69–76.

- Hassold, T., and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2, 280–291.
- Hassold, T., Sherman, S., and Hunt, P. (2000). Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2409–2419.
- Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet. 16 Spec No. 2*, R203–208.
- Hassold, T.J., Burrage, L.C., Chan, E.R., Judis, L.M., Schwartz, S., James, S.J., Jacobs, P.A., and Thomas, N.S. (2001). Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 434–439.
- Hawley, R.S. (2003). Human meiosis: model organisms address the maternal age effect. *Curr. Biol. CB 13*, R305–307.
- Hawley, T.S., and Hawley, R.G. (2004). *Flow Cytometry Protocols* (Springer).
- Hittmair, A., Rogatsch, H., Mikuz, G., and Feichtinger, H. (1994). Quantification of spermatogenesis by dual-parameter flow cytometry. *Fertil. Steril.* 61, 746–750.
- Ihara, M., Meyer-Ficca, M.L., Leu, N.A., Rao, S., Li, F., Gregory, B.D., Zalenskaya, I.A., Schultz, R.M., and Meyer, R.G. (2014). Paternal poly (adp-ribose) metabolism modulates retention of inheritable sperm histones and early embryonic gene expression. *PLoS Genet.* 10, e1004317.
- In't Veld, P., Brandenburg, H., Verhoeff, A., Dhont, M., and Los, F. (1995). Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346, 773.
- In't Veld, P.A., Broekmans, F.J., de France, H.F., Pearson, P.L., Pieters, M.H., and van Kooij, R.J. (1997). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 12, 752–754.
- Inglot, P., Lewinska, A., Potocki, L., Oklejewicz, B., Tabecka-Lonczynska, A., Kozirowski, M., Bugno-Poniewierska, M., Bartosz, G., and Wnuk, M. (2012). Cadmium-induced changes in genomic DNA-methylation status increase aneuploidy events in a pig Robertsonian translocation model. *Mutat. Res.* 747, 182–189.
- De Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., and Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 13 *Suppl 1*, 1–8.
- Koscinski, I., Wittemer, C., Rigot, J.M., De Almeida, M., Hermant, E., and Defossez, A. (2005). Seminal haploid cell detection by flow cytometry in non-obstructive azoospermia: a good predictive parameter for testicular sperm extraction. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20, 1915–1920.
- Kovács, T., Békési, G., Fábrián, A., Rákósy, Z., Horváth, G., Mátyus, L., Balázs, M., and Jenei, A. (2008). DNA flow cytometry of human spermatozoa: consistent stoichiometric staining of sperm DNA using a novel decondensation protocol. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 73, 965–970.

Lamb, N.E., Freeman, S.B., Savage-Austin, A., Pettay, D., Taft, L., Hersey, J., Gu, Y., Shen, J., Saker, D., May, K.M., et al. (1996). Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat. Genet.* *14*, 400–405.

Lazaros, L., Kaponis, A., Vartholomatos, G., Hatzi, E., Botsari, S., Plachouras, N., Makrydimas, G., Zikopoulos, K., Sofikitis, N., and Georgiou, I. (2011a). Using semen flow cytometry to evaluate association of ploidy status and chromatin condensation of spermatozoa with conventional semen parameters: clinical application in intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* *95*, 110–115.

Lazaros, L.A., Vartholomatos, G.A., Hatzi, E.G., Kaponis, A.I., Makrydimas, G.V., Kalantaridou, S.N., Sofikitis, N.V., Stefos, T.I., Zikopoulos, K.A., and Georgiou, I.A. (2011b). Assessment of sperm chromatin condensation and ploidy status using flow cytometry correlates to fertilization, embryo quality and pregnancy following in vitro fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* *28*, 885–891.

Lazaros, L., Vartholomatos, G., Pamporaki, C., Kosmas, I., Takenaka, A., Makrydimas, G., Sofikitis, N., Stefos, T., Zikopoulos, K., Hatzi, E., et al. (2013). Sperm flow cytometric parameters are associated with ICSI outcome. *Reprod. Biomed. Online* *26*, 611–618.

Levek-Motola, N., Soffer, Y., Shochat, L., Raziel, A., Lewin, L.M., and Golan, R. (2005). Flow cytometry of human semen: a preliminary study of a non-invasive method for the detection of spermatogenetic defects. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *20*, 3469–3475.

Lewin, L.M., Golan, R., Freidlin, P., and Shochat, L. (1999). A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *124*, 133–137.

Lewis, S.E.M. (2007). Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* *134*, 31–40.

Miller, O.J., and Therman, E. (2001). *Human Chromosomes* (Springer).

Molina, J., Castilla, J.A., Gil, T., Hortas, M.L., Vergara, F., and Herruzo, A. (1995). Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *10*, 1280–1286.

Molina, J., Castilla, J.A., Castaño, J.L., Fontes, J., Mendoza, N., and Martinez, L. (2001). Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *16*, 534–539.

Morel, F., Mercier, S., Roux, C., Elmrini, T., Clavequin, M.C., and Bresson, J.L. (1998). Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fertil. Steril.* *69*, 1122–1127.

- Moretti, E., Pascarelli, N.A., Giannerini, V., Geminiani, M., Anichini, C., and Collodel, G. (2009). 18, X, Y aneuploidies and transmission electron microscopy studies in spermatozoa from five carriers of different reciprocal translocations. *Asian J. Androl.* *11*, 325–332.
- Mukai, C., and Travis, A.J. (2012). What sperm can teach us about energy production. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* *47 Suppl 4*, 164–169.
- Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Alvarez, J.G., and Fernández, J.L. (2007). Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J. Androl.* *28*, 38–49.
- Nicklas, R.B. (1997). How cells get the right chromosomes. *Science* *275*, 632–637.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, *et al.* 2005. *Thompson & Thompson Genética en medicina* (5a ed.). Barcelona: Masson, pp. 5-16. ISBN: 84-458-1225-4
- Ovári, L., Sati, L., Stronk, J., Borsos, A., Ward, D.C., and Huszar, G. (2010). Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies. *Fertil. Steril.* *93*, 2255–2261.
- Pacey, A.A. (2010). Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum. Fertil. Camb. Engl.* *13*, 189–193.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., and Van Steirteghem, A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* *340*, 17–18.
- Pang, M.G., Hoegerman, S.F., Cuticchia, A.J., Moon, S.Y., Doncel, G.F., Acosta, A.A., and Kearns, W.G. (1999). Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *14*, 1266–1273.
- Peña, F.J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J.A., Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., and Macías García, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* *44*, 345–349.
- Petit, F.M., Frydman, N., Benkhalifa, M., Le Du, A., Aboura, A., Fanchin, R., Frydman, R., and Tachdjian, G. (2005). Could sperm aneuploidy rate determination be used as a predictive test before intracytoplasmic sperm injection? *J. Androl.* *26*, 235–241.
- Petronczki, M., Siomos, M.F., and Nasmyth, K. (2003). Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* *112*, 423–440.
- Pfitzer, P., Gilbert, P., Rölz, G., and Vyska, K. (1982). Flow cytometry of human testicular tissue. *Cytometry* *3*, 116–122.

- Pinton, A. (2004a). Caracterisation d'anomalies chromosomiques dans l'espèce porcine et analyse des déséquilibres chromosomiques dans les gamètes des reproducteurs porteurs hétérozygotes. Tesis doctoral. École pratique des hautes études science de la vie et de la terre.
- Piomboni, P., Stendardi, A., and Gambera, L. (2014). Chromosomal aberrations and aneuploidies of spermatozoa. *Adv. Exp. Med. Biol.* *791*, 27–52.
- Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P.C., Sousa, A.P., and Amaral, A. (2009). Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum. Reprod. Update* *15*, 553–572.
- Robbins, W.A. (2003). FISH (fluorescence in situ hybridization) to detect effects of smoking, caffeine, and alcohol on human sperm chromosomes. *Adv. Exp. Med. Biol.* *518*, 59–72.
- Robbins, W.A., Elashoff, D.A., Xun, L., Jia, J., Li, N., Wu, G., and Wei, F. (2005). Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. *Cytogenet. Genome Res.* *111*, 371–377.
- Roosen-Runge, E.C. (1962). The Process of Spermatogenesis in Mammals*. *Biol. Rev.* *37*, 343–376.
- Rubio, C., Simón, C., Blanco, J., Vidal, F., Mínguez, Y., Egozcue, J., Crespo, J., Remohí, J., and Pellicer, A. (1999). Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J. Assist. Reprod. Genet.* *16*, 253–258.
- Rubio, C., Gil-Salom, M., Simón, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Mínguez, Y., Remohí, J., and Pellicer, A. (2001). Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *16*, 2084–2092.
- Saacke, R.G. (2008). Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* *70*, 473–478.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., and Bianchi, U. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.* *4*, 31–37.
- Sarrate, Z., and Anton, E. (2009). Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Shi, Q., Spriggs, E., Field, L.L., Rademaker, A., Ko, E., Barclay, L., and Martin, R.H. (2002). Absence of age effect on meiotic recombination between human X and Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* *71*, 254–261.
- Silva, P.F.N., and Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* *65*, 958–978.

- Sinha, K., Das, J., Pal, P.B., and Sil, P.C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch. Toxicol.* 87, 1157–1180.
- Schmid, T.E., Kamischke, A., Bollwein, H., Nieschlag, E., and Brinkworth, M.H. (2003). Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the Comet assay. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18, 1474–1480.
- Sun, F., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Starke, H., Ko, E., Rademaker, A., Navarro, J., Benet, J., and Martin, R.H. (2004). Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 521–531.
- Sun, F., Ko, E., and Martin, R.H. (2006). Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 4, 1.
- Tang, S.S., Gao, H., Zhao, Y., and Ma, S. (2010). Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *Int. J. Androl.* 33, e163–179.
- Tempest, H.G., and Martin, R.H. (2009). Cytogenetic risks in chromosomally normal infertile men. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 21, 223–227.
- Tempest, H.G., Ko, E., Rademaker, A., Chan, P., Robaire, B., and Martin, R.H. (2009). Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertil. Steril.* 91, 185–192.
- Thornhill, A.R., deDie-Smulders, C.E., Geraedts, J.P., Harper, J.C., Harton, G.L., Lavery, S.A., Moutou, C., Robinson, M.D., Schmutzler, A.G., Scriven, P.N., et al. (2005). ESHRE PGD Consortium “Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS).” *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20, 35–48.
- Thomas, C., Cans, C., Pelletier, R., De Robertis, C., Hazzouri, M., Sele, B., Rousseaux, S., and Hennebicq, S. (2004). No long-term increase in sperm aneuploidy rates after anticancer therapy: sperm fluorescence in situ hybridization analysis in 26 patients treated for testicular cancer or lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 6535–6543.
- Van Assche, E., Bonduelle, M., Tournaye, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. (1996). Cytogenetics of infertile men. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 11 *Suppl* 4, 1–24; discussion 25–26.
- Van Steirteghem, A., Nagy, P., Joris, H., Verheyen, G., Smits, J., Camus, M., Tournaye, H., Ubaldi, F., Bonduelle, M., Silber, S., et al. (1996). The development of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 11 *Suppl* 1, 59–72; discussion 81–85.
- Van Steirteghem, A., Bonduelle, M., Devroey, P., and Liebaers, I. (2002). Follow-up of children born after ICSI. *Hum. Reprod. Update* 8, 111–116.

Van Steirteghem, A.C., Liu, J., Joris, H., Nagy, Z., Janssenswillen, C., Tournaye, H., Derde, M.P., Van Assche, E., and Devroey, P. (1993). Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 8, 1055–1060.

Vegetti, W., Van Assche, E., Frias, A., Verheyen, G., Bianchi, M.M., Bonduelle, M., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2000). Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 15, 351–365.

Vidal, F., Blanco, J., Fugger, E.F., Keyvanfar, K., Norton, M., Schulman, J.D., and Egozcue, J. (1999). Preliminary study of the incidence of disomy in sperm fractions after MicroSort flow cytometry. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 14, 2987–2990.

Viloria, T., Garrido, N., Fernández, J.L., Remohí, J., Pellicer, A., and Meseguer, M. (2007). Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil. Steril.* 88, 523–525.

Weissenberg, R., Aviram, A., Golan, R., Lewin, L.M., Levron, J., Madgar, I., Dor, J., Barkai, G., and Goldman, B. (1998). Concurrent use of flow cytometry and fluorescence in-situ hybridization techniques for detecting faulty meiosis in a human sperm sample. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 61–66.

Xu, T., Li, L., Min, Z.-L., and Zhu, Y.-H. (2002). [Analysis of DNA content of spermatogenic cells in the adult human testis and epididymis by flow cytometry]. *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.* 8, 335–337.

Yeung, C.H., Beiglböck-Karau, L., Tüttelmann, F., and Nieschlag, E. (2007). The presence of germ cells in the semen of azoospermic, cryptozoospermic and severe oligozoospermic patients: stringent flow cytometric analysis and correlations with hormonal status. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 67, 767–775

Zaragoza, M.V., Surti, U., Redline, R.W., Millie, E., Chakravarti, A., and Hassold, T.J. (2000). Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1807–1820.

Zhou, D., Xia, Y., Li, Y., Song, L., Hu, F., Lu, C., Zhou, Z., Sha, J., and Wang, X. (2011). Higher proportion of haploid round spermatids and spermatogenic disomy rate in relation to idiopathic male infertility. *Urology* 77, 77–82.

Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., and Zenzes, M.T. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 75, 674–677.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 2010.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Preparación de las soluciones para el análisis con SCSA

Solución de naranja de acridina (AO)

Solución stock (1mg/mL en H₂O)

Se utilizó AO en polvo (Poysciences 04539). Se pesó en la balanza de precisión la cantidad de AO, entre 3 y 6 mg. Se añadió el equivalente peso/volumen de agua bidestilada, de manera que la solución final quedó a una concentración de 1 mg/mL. La solución stock se mantuvo a 4 °C y en condiciones de oscuridad.

Solución de trabajo

Se añadieron cloruro de sodio (150 mM), ácido cítrico (100mM), fosfato de sodio dibásico (200 mM) y EDTA disódico (1 mM) a un volumen final de agua bidestilada. Fue conveniente mantener en agitación la solución hasta que el EDTA se ha disuelto completamente. Posteriormente, se ajustó el pH a 6 con ayuda de bases y ácidos concentrados. Se enrasó con agua bidestilada hasta el volumen definitivo y se pasó la solución a una botella específica para AO. A continuación, se añadieron 6 mL de la solución stock de naranja de acridina por cada litro de solución. Se alcanzó una concentración final de 6 mg/L (0,02 mM). Esta solución se almacenó a 4 °C en oscuridad.

Solución del detergente-ácido

La solución se compone de una dilución en agua bidestilada de cloruro de sodio (150 mM), Triton X-100 (0,1%), ácido clorhídrico(2N) (80 mM). El pH se ajustó a 1,2 con el uso de ácido. Esta solución se almacenó a 4 °C. Fue conveniente tener cuidado con el Triton debido a la espuma que se crea si se agita.

AGRADECIMIENTOS

En particular, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Felipe Martínez Pastor, director de este trabajo, por su paciencia y dedicación para que este trabajo se haya podido llevar a término.

A mis compañeras del laboratorio del INDEGSAL de la Universidad de León por explicarme la rutina de día a día.

A mis amigas del Máster, por sus ánimos en los días en que todo parecía imposible.

A mi familia, amigos y todas las personas que han hecho posible que este trabajo se haya podido realizar.

