

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA**

**Y**

**TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

**Daños en el ADN espermático ovino tras una  
incubación prolongada con distintos  
tratamientos oxidantes**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER  
POR**

**Cristina Gómez Seco**

**Tutor: Dr. Felipe Martínez Pastor**

**JUNIO 2012**



D. Felipe Martínez Pastor, investigador “Ramón y Cajal” del Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal de la Universidad de León, y responsable de la línea de investigación “Evaluación del daño en el ADN mediante qPCR y de la presencia del marcador apoptótico PARP en espermatozoides de rumiantes”,

Informa:

Que D.<sup>a</sup> Cristina Gómez Seco ha realizado bajo su supervisión el trabajo de fin de máster titulado “Daños en el ADN espermático ovino tras una incubación prolongada con distintos tratamientos oxidantes”, y autoriza su presentación, dado que reúne las condiciones necesarias.

En León, a 6 de junio de 2012.

Fdo.: Felipe Martínez Pastor

# Índice.

1. Resumen.	2
2. Índice de abreviaturas.	3
3. Introducción.	4
3.1. La inseminación artificial y su aplicación en el ganado ovino.	4
3.2. Factores generales que afectan a la fertilidad en el ganado ovino.	5
3.3. Factores específicos que afectan a la inseminación artificial del ganado ovino.	6
3.4. Efectos del estrés oxidativo sobre los espermatozoides.	9
3.5. Análisis del DNA del espermatozoide.	11
3.6. Aplicación del análisis mediante SCSA.	16
3.7. Encuadre del estudio y análisis del DNA mediante qPCR.	19
4. Hipótesis y objetivos.	21
5. Material y métodos.	22
5.1. Diseño experimental.	22
5.2. Animales utilizados.	22
5.3. Recogida y procesado del semen.	22
5.4. Congelación de las dosis seminales.	23
5.5. Preparación de las muestras para el experimento.	24
5.6. Preparación de los oxidantes.	24
5.7. Preparación de las muestras con los oxidantes.	25
5.8. Análisis mediante SCSA.	26
5.9. Análisis estadístico.	28
6. Resultados.	34
7. Discusión.	67
8. Conclusiones.	75
9. Bibliografía.	76
10. Anexo I. Composición de los medios y soluciones utilizados.	83
11. Anexo II. Datos obtenidos del análisis de citometría de flujo.	87
12. Anexo III. Memoria de prácticas.	98

## 1. Resumen.

El  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y el reactivo de Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) son reactivos que producen especies reactivas del oxígeno (ROS), y se han utilizado en numerosos estudios para investigar los efectos del estrés oxidativo. En este trabajo, investigamos el efecto de estos reactivos en el DNA espermático, realizando un estudio comparativo en espermatozoides descongelados de carnero. Se probaron una concentración baja, media y alta de cada uno de los agentes: 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato; 1 mM, 10 mM y 100 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ . Los espermatozoides se incubaron a 37 °C y se recogieron muestras a las 0 (control), 3, 6 y 24 horas. Utilizamos el método SCSA (Sperm chromatin structure assay) para analizar el daño a la cromatina de los espermatozoides. Nuestros resultados mostraron que los parámetros de SCSA relacionados con la fragmentación del DNA (DFI, Índice de fragmentación del DNA, xDFI, SDDFI) aumentaron notablemente con el tratamiento  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato 1 mM, y más ligeramente en 0,1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato a todos los tiempos, y con 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (solo a las 24 h). Las muestras tratadas con el reactivo de Fenton no mostraron cambios evidentes con el tiempo, y, en su mayor parte, no se diferenciaron de las muestras Control. Estos resultados han ayudado a definir la sensibilidad del SCSA a distintos tipos de agentes oxidantes, y servirán en la puesta a punto de métodos basados en PCR para el análisis del daño al DNA espermático, utilizando el SCSA como referencia.

## 2. Índice de abreviaturas.

COMP: cells outside the main population.

DFI: DNA fragmentation index.

Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: reactivo de Fenton.

hDFI: high DNA fragmentation index

HDS: high DNA stainability.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno.

IA: inseminación artificial.

ISNT: In situ nick translation.

mDFI: moderate DNA fragmentation index.

NO: óxido nítrico.

qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

ROS: reactive oxygen species.

SCD: Sperm chromatin dispersion.

SCSA: Sperm chromatin structure assay.

SDDFI: standart desviation of the DFI.

tDFI: total DNA fragmentation index.

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

xDFI: mean DFI.

### **3. Introducción.**

#### **3.1. La inseminación artificial y su aplicación en el ganado ovino.**

El desarrollo de la inseminación artificial (IA) y la consecuente mejora genética de los animales de granja ha permitido un notable incremento en la productividad del ganado. Las principales ventajas de la IA frente a la monta natural son:

- Elimina el coste de mantenimiento y traslado de los machos.
- Evita la introducción de enfermedades nuevas en el rebaño, en especial enfermedades de transmisión sexual (Vishwanath, 2003).
- Acelera la mejora genética (Schakell et al., 1990).
- Facilidad en el transporte del semen (Schakell et al., 1990).
- Posibilidad de elegir el sexo de la descendencia con la utilización de semen sexado.

La IA en ovino se encuentra apenas generalizada en comparación con otras especies domésticas, como el vacuno. Esto es debido a los bajos e irregulares porcentajes de fertilidad, y también a la dificultad en la aplicación de mejoras en el uso de semen criopreservado (Anel et al., 2006). Esto ha impedido el uso reproductivo de la IA en ovino, quedando limitada a una herramienta dentro de programas de mejora.

En el presente trabajo hemos utilizado ovejas de raza Assaf. Actualmente hay censadas en España de 600.000 a 700.000 ovejas de raza Assaf, distribuidas en algo más de mil rebaños (de 1.060 a 1.300), según la Asociación de la raza ([www.assafe.es](http://www.assafe.es)). El régimen de explotación es mayoritariamente intensivo y se encuentran distribuidas principalmente por la cuenca del Duero. La principal herramienta utilizada para la mejora de esta raza es la IA.

La IA en ovino se lleva a cabo fundamentalmente con semen refrigerado debido a los bajos resultados de fertilidad obtenidos con semen congelado-descongelado (Salamon and Maxwell, 2000). La complejidad de anatomía del cuello uterino de la oveja impide la IA uterina profunda, reduciendo la eficiencia de la técnica (Halbert et

al., 1990). En la actualidad, la IA laparoscópica es el método alternativo para la utilización de semen congelado-descongelado (Eppleston and Maxwell, 1995).

### **3.2. Factores generales que afectan a la fertilidad en el ganado ovino.**

La IA se encuentra afectada por numerosos factores, en primer lugar, por aquellos factores que afectan en general a la fertilidad del ganado ovino, entre los que podemos destacar:

- Relativos a la hembra: estatus sanitario, edad, tiempo que transcurre entre el parto y la siguiente IA, estacionalidad, etc.
- Relativos al macho: estatus sanitario, diferencias entre machos, estacionalidad, entre otros.
- Estatus de la granja (condiciones ambientales y sanitarias, manejo, etc. (Paulenz et al., 2004).

En cuanto a los factores relativos a la hembra, se ha visto que la estacionalidad es un factor muy importante en la fertilidad. En estudios realizados en ovejas de raza Churra, la fertilidad es mayor cuando la IA se realiza de septiembre a enero, coincidiendo con la época reproductiva, que cuando se realiza en verano (julio o agosto) fuera de su época reproductiva (Tabla 1). También la edad de la oveja afecta a la fertilidad. Los mejores índices de fertilidad se han visto en ovejas entre 1,5 y 4,5 años de edad, mientras que a partir de los 4,5 años la fertilidad decae considerablemente. Otro factor a tener en cuenta es el tiempo que transcurre entre el parto y la siguiente IA. Cuando este periodo es menor de 10 semanas, la fertilidad disminuye (Tabla 1). Y por último, la sincronización de los estros mediante tratamientos hormonales, se ha observado que tienen un efecto negativo en la fertilidad (Anel et al., 2005).

Los índices reproductivos también varían entre granjas. Un buen manejo reproductivo (intervalos entre partos, estación de las cubriciones, edad de la primera cubrición, etc.) junto a un adecuado manejo de la alimentación y un buen estado

sanitario repercuten de manera positiva en los índices de fertilidad (Tabla 1) (Anel et al., 2005).

Los factores masculinos son muchos e importantes, entre ellos el estado sanitario, la estacionalidad y la variabilidad entre machos.

### 3.3. Factores específicos que afectan a la inseminación artificial del ganado ovino.

Los factores, que en particular, afectan a la fertilidad de la IA del ganado ovino son el método de conservación seminal, la técnica de IA y la complejidad anatómica del cuello uterino de la oveja.

La conservación del semen es uno de los factores críticos a tener en cuenta. Existen dos métodos para conservar el semen y alcanzar unos resultados aceptables de fertilidad: congelación o refrigeración (Anel et al., 2006). Tanto la refrigeración como la congelación persiguen reducir el metabolismo del espermatozoide y prolongar su vida fértil (Anel et al., 2005).

Según el método de conservación se realiza una técnica diferente de inseminación. Si el semen está refrigerado se realiza una IA vía vaginal y si es semen

Tabla 1. Factores que afectan la fertilidad de la IA en ovejas de raza Churra (Anel et al., 2005).

Factores de variación	Total IA n ± 44 448	AIV n ± 17 631	LAI n ± 26 817
Técnica de inseminación	***		
Graja	***	***	***
Año	***	***	***
Estación	***	***	***
Edad de la oveja	***	**	***
Intervalo parto-IA	***	***	***
Carnero	***	***	***
Técnico	***	***	***
Nº de IA/oveja	N.S.	*	N.S.

AIV, inseminación vaginal– cervical; LAI, inseminación laparoscópica- artificial

N.S., no significativo ( $p \neq 0.05$ ).

\* Efecto significativo ( $p < 0.05$ ).

\*\* Efecto muy significativo ( $p < 0.01$ ).

\*\*\* Efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ).



congelado, se debe depositar el semen en el útero mediante una laparoscopia (Anel et al., 2006).

La refrigeración consiste en conservar en estado líquido el semen. Esto se consigue disminuyendo la temperatura del semen hasta los 15 °C. El éxito de este método depende de muchos factores, como la temperatura de refrigeración, la composición del diluyente o el número de espermatozoides de la dosis (Anel et al., 2006). Si el semen está refrigerado se realiza una inseminación vía vaginal. El uso de semen conservado a 15 °C durante menos de 6 h permite obtener resultados aceptables y consistentes de fertilidad, y el uso de la IA por vía vaginal. En este caso, la deposición del semen puede ser vaginal, en la región media del cérvix o en la parte distal del cérvix. Se ha demostrado que la deposición en el cérvix aumenta la fertilidad respecto a la deposición vaginal (Kerton et al 1984., 53% frente al 31%). Otros autores indican que la fertilidad aumenta si la deposición es en el cérvix distal respecto a una deposición en la región media (Windsor et al., 1994). No obstante, la IA transcervical (intentando depositar el semen en la parte distal del cérvix o en el útero) es complicada.

La anatomía del cérvix ovino es muy compleja, dificultando el paso del catéter de inseminación. Además, el pequeño tamaño de la oveja impide manipular el cérvix desde el recto, tal como se hace en ganado vacuno. Se han realizado estudios comparando la morfología del cuello uterino de diferentes razas de ovejas, y se han observado diferencias significativas entre las razas estudiadas. El cuello uterino de la oveja es un obstáculo cuando se pretende hacer una inseminación intrauterina transcervical (Anel et al., 2006). Los anillos cervicales (varían en número de 3 a 7) presentan una forma cónica y una estrecha luz de 1 a 3 mm de diámetro, que definen un estrecho y angosto canal, debido a que los anillos se encuentran situados de manera excéntrica (Figura 1), lo que dificulta el paso del catéter de inseminación (Kershaw et al., 2005). En un estudio se ha observado que el cuello uterino sufre modificaciones anatómicas según avanza la edad de las ovejas. El cuello uterino de las ovejas con mayor edad es más largo y ancho, lo cual mejora el paso del catéter de inseminación (Kaabi et al., 2006).

La congelación del semen de carnero produce cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales en un gran número de espermatozoides que disminuyen el movimiento y viabilidad de los mismos en tracto genital femenino (Salamon and Maxwell, 2000). Incluso se ha visto que se incrementa la mortalidad embrionaria (Salamon and Maxwell, 1995). Por estos motivos, el semen congelado debe depositarse en útero para mantener los índices de fertilidad (Killen and Caffery, 1982, Curry, 2000) por la complejidad anatómica del cuello uterino de la oveja, que disminuye especialmente la fertilidad de este tipo de muestras. La deposición seminal intrauterina se realiza por vía laparoscópica, siendo mínimamente invasiva.

La laparoscopia tiene la ventaja de que permite la visualización de los ovarios de la oveja, y de esta forma se puede inseminar en el cuerno ipsilateral al ovario que esta ovulando y así disminuir la dosis seminal. También permite diagnosticar alteraciones del aparato genital (malformaciones, adhesiones, patologías del ovarios ente otras) que mediante una inseminación convencional no se pueden diagnosticar. Como desventajas, esta técnica es compleja, cara y necesita de personal entrenado (Anel et al., 2005).

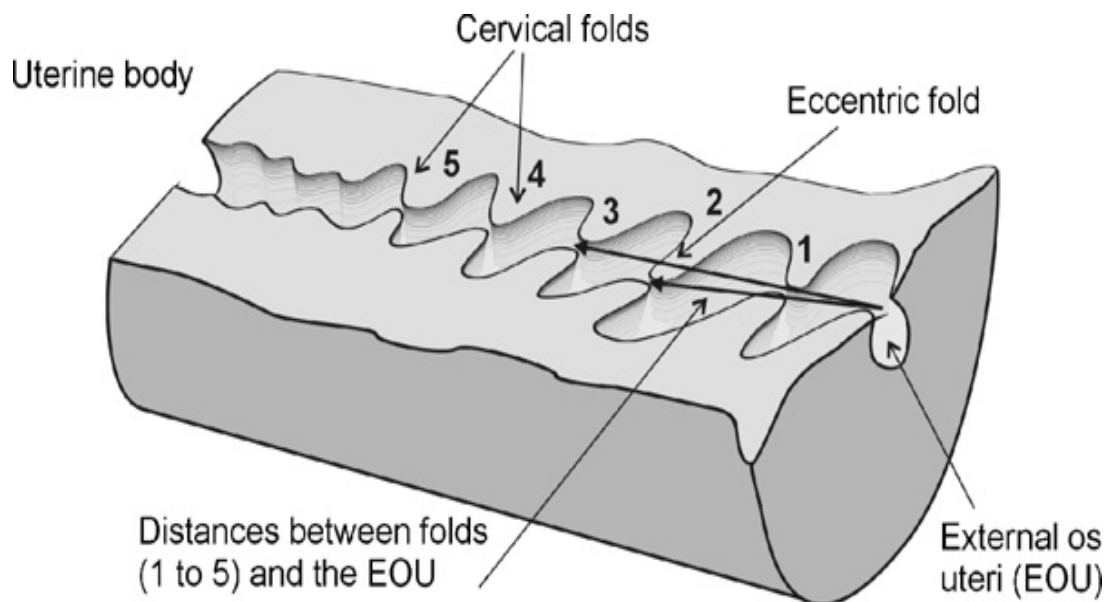


Figura 1. Organización interna del cuello uterino de la oveja (Kaabi et al., 2006).

En un estudio comparativo entre la inseminación artificial por vía vaginal con semen refrigerado y por laparoscopia con semen congelado, el porcentaje de partos fue 13 puntos superior después de la inseminación por laparoscopia (Anel et al., 2005).

El método ideal sería depositar el semen congelado en el útero por vía vaginal, manteniendo la fertilidad al nivel del semen refrigerado. Se han descrito diferentes métodos para llegar al útero produciendo las mínimas lesiones en el cérvix de la oveja, mediante el uso de fórceps, tratamientos hormonales o modificando el diseño de los catéteres de inseminación, pero no se ha conseguido un método eficaz (Anel et al., 2006).

#### **3.4. Efectos del estrés oxidativo sobre los espermatozoides.**

La crioconservación del semen produce una disminución de la fertilidad, probablemente debido al estrés causado durante el almacenamiento in vitro. El estudio de los procesos que tienen lugar durante este almacenamiento permite comprender la disminución de la fertilidad del semen. Los espermatozoides tienen la capacidad de generar radicales libres, como la especie reactiva del oxígeno (ROS) que producen varios fenómenos indeseables, tal como la peroxidación lipídica (de Lamirande et al., 1997). Los altos niveles de peroxidación lipídica dan lugar a una desestabilización de las membranas que puede producir la muerte celular. Los ROS provocan también una alteración de la motilidad y de la integridad de la cromatina espermática. La alteración de la cromatina espermática compromete la fertilidad espermática y la viabilidad de los embriones (Salamon and Maxwell, 2000).

¿Qué son los ROS? El oxígeno intracelular es vital para la producción de ATP por las mitocondrias. La mayor parte del oxígeno acepta los electrones de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, reduciéndose a agua. Sin embargo, en las células sanas, del 1% al 2% del oxígeno es convertido en radicales libres. Estos incluyen al anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). El  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  se forman como subproductos del  $O_2$ , mientras que el radical hidroxilo se forma por la interacción entre el  $H_2O_2$  y algunos cationes metálicos (Rhoades and Pflander, 1996). Otros radicales libres son las especies reactivas del nitrógeno. El óxido nítrico

(NO), una molécula mensajera importante, es biosintetizado por numerosas isoformas de enzimas (óxido nítrico sintasas) (Herrero and Gagnon, 2001). El peróxido nítrico se produce por la interacción entre el NO y O<sub>2</sub> (Moran et al., 2008).

Los ROS tienen un papel fundamental en la fisiología espermática. A niveles bajos inducen la capacitación (de Lamirande and Gagnon, 1992), la fusión del espermatozoide con el ovocito (Ford, 2004) y la reacción acrosómica (Aitken et al., 1989), pero su exceso daña el espermatozoide (Aitken and Baker, 2002) y pueden desencadenar una capacitación espermática o la reacción acrosómica temprana (Oehninger et al., 1995).

Los ROS causan daños celulares porque reaccionan con los fosfolípidos, oxidan los grupos sulfidrilos de las enzimas y proteínas e inducen rupturas en el DNA. El anión superóxido y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pueden difundir por la célula y generalizar los daños. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de traspasar las membranas celulares, pero es moderadamente reactivo. En cambio, el ·OH es solamente una amenaza alrededor del lugar de producción, dada su corta vida media, pero es muy reactivo (Rhoades and Pflander 1996). El NO tiene muchos roles en la fisiología del espermatozoide pero causa muchos daños cuando su concentración es elevada (Herrero et al., 2003). Por ejemplo, se ha visto que el aumento de NO en los espermatozoides de cerdo, induce la apoptosis por la activación de la vía de las caspasas en la mitocondria (Moran et al., 2008).

El daño causado por los ROS a los espermatozoides durante el almacenamiento es muy amplio. Se han descrito desde alteraciones del DNA (Lopes et al., 1998), que disminuyen el potencial reproductivo (Evenson and Wixon, 2006), cambios en la pieza intermedia que disminuyen la movilidad (de Lamirande et al., 1997), reestructuración del acrosoma que impide la fusión del ovocito y el espermatozoide (Aitken 1989) y alteraciones en el citoesqueleto (Hinshaw et al., 1986).

Durante la manipulación del semen en los laboratorios se puede inducir estrés oxidativo. Así, el lavado del semen o el swim-up, asociadas a repetidas centrifugaciones, pueden aumentar la producción de ROS (Agarwal et al., 1994). Durante otros procesos como la ICSI, donde la mala calidad de la muestra es una de las

características, las diferentes manipulaciones a las que se somete la muestra para prepararla, aumentan la producción de ROS. Se ha comprobado que la exposición de espermatozoides durante más de 1 hora a ROS, aumenta la fragmentación del DNA (Lopes et al., 1998). Por ello, es interesante proteger a los espermatozoides de los ROS durante su manipulación y criopreservación (Martínez-Pastor et al., 2009).

### **3.5. Análisis del DNA del espermatozoide.**

Se han descrito varias técnicas para la identificación de defectos en el DNA y la cromatina espermática que permiten un estudio completo del espermatozoide. Estas técnicas permiten identificar los espermatozoides con daños en la cromatina y proporcionan métodos predictivos más viables para la infertilidad masculina (Evenson et al., 2002).

Estas técnicas son:

TUNEL

Comet

In situ Nick translation

SCD

SCSA

#### **Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL):**

Esta prueba permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el DNA, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza, in situ, mediante la acción de una transferasa terminal. Esta enzima incorpora deoxiuridina modificada con biotina o digoxigenina. Posteriormente, los nucleótidos modificados se detectan tras una reacción con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo como molécula trazadora. En una variante, el nucleótido incorporado está directamente marcado con el fluorocromo. Teóricamente,

la señal de marcado obtenida por cada espermatozoide se incrementaría de acuerdo con el número de roturas que presente la cadena de DNA.

La técnica ha tenido una buena aceptación dado que es versátil, esta comercializada en kit y los resultados pueden ser interpretados mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (Lopes et al., 1998; Chohan et al., 2006).

Su uso no se ha expandido en la rutina clínica por tres razones:

1) Requiere equipo sofisticado para su análisis.

2) Requiere personal especializado.

3) El material que se utiliza viene precedido por un proceso de fijación de la cromatina que puede dificultar el acceso de las enzimas y la propia actividad enzimática puede ser irregular (Cortés-Gutiérrez et al., 2007).

4) Alto coste.

#### **Comet:**

En realidad, este ensayo es una adaptación de la electroforesis de DNA desnudo, comúnmente utilizada en el campo de la biología molecular. La idea es que el DNA de un núcleo desproteinizado que contenga roturas en sus cadenas de DNA estará más libre para ser movilizado hacia el polo positivo, cuando éste se someta a un campo eléctrico (Aravindan et al., 1997). La metodología básica consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidrilo que se encuentran entre las protaminas del espermatozoide, como por ejemplo DTT (ditiotreitól).

Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes del tipo DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole), IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN. De esta forma, el DNA fragmentado, se desplaza generando una imagen similar a la de un cometa (Figura 2). Aquellos espermatozoides con su DNA íntegro no generan o sólo producen colas cortas, mientras que aquellos núcleos que tienen su DNA dañado

muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de DNA (Singh et al., 1988).

El mayor inconveniente de este ensayo es que requiere un material de uso no común en un laboratorio de andrología, como son fuentes de electroforesis para DNA, y para la interpretación de los resultados se requiere un observador con experiencia o bien un software específico para que la prueba tenga cierta objetividad (Cortés-Gutiérrez et al., 2007).

#### **In situ nick translation (ISNT):**

La ISNT es básicamente una técnica de concepción similar al TUNEL ya que permite cuantificar el grado de daño que se produce en el DNA evaluando tras la incorporación de moléculas de dUTP modificado con biotina o digoxigenina, o bien marcando directamente el DNA con un fluorocromo conjugado con un nucleótido modificado, tras utilizar la enzima DNA polimerasa I.

La mayor diferencia con el TUNEL radica en que existe una actividad enzimática exonucleasa, y la incorporación de nucleótidos es mayor por utilizar la cadena de DNA complementaria como molde. Los resultados del análisis de ISNT se han utilizado para el estudio de la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide (Gorczyca et al., 1993). Desde el punto de vista práctico, esta técnica tendría las mismas prestaciones e inconvenientes que la de TUNEL, pero no existe un kit disponible de modo comercial para su aplicación directa sobre espermatozoides (Cortés-Gutiérrez et al., 2007).

#### **SCD:**

Esta técnica se basa en el papel que juegan los puentes disulfuro en la compactación de la cromatina de los espermatozoides. El DNA del espermatozoide se encuentra unas seis veces más compactado que en del cromosoma mitótico, organizado en bucles de menor tamaño que el de las células somáticas, anclados a la matriz nuclear. Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura mediante la formación de puentes disulfuro entre ellas (Cortés-Gutiérrez et al., 2007). Si se rompen los enlaces

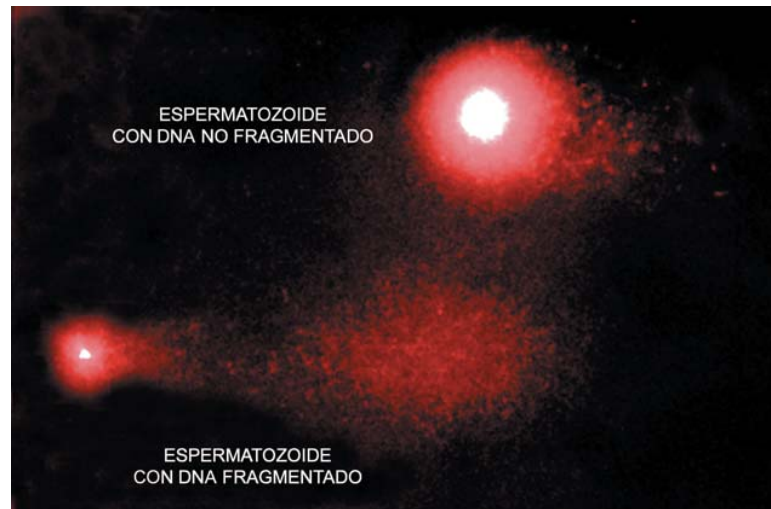


Figura 2. Visualización de la integridad del DNA mediante el ensayo de cometa. Los espermatozoides que presentan el DNA fragmentado (parte inferior de la figura) muestran un claro desplazamiento de los fragmentos de DNA al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico. Este desplazamiento no se aprecia en los núcleos que mantienen el DNA íntegro (parte superior de la figura) (Cortés-Gutiérrez et al., 2007).

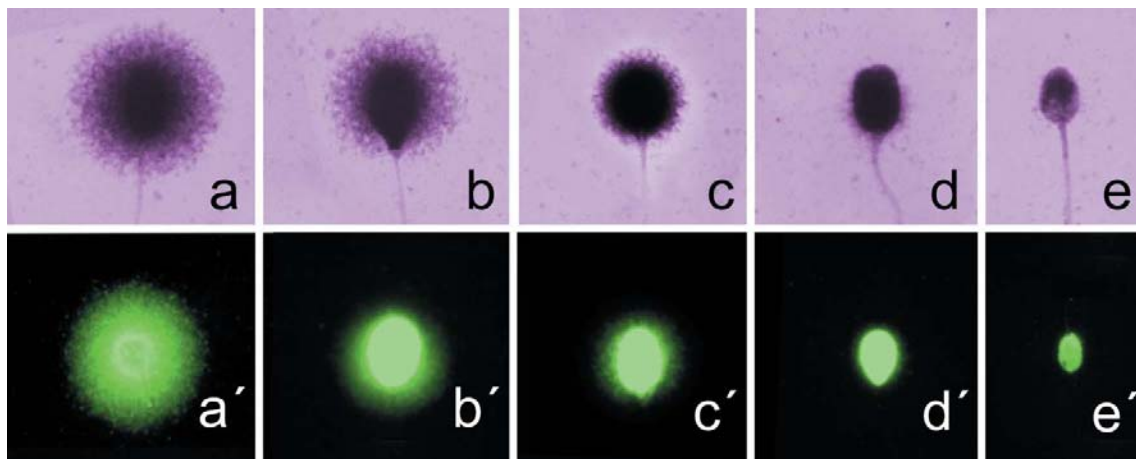


Figura 3. Visualización de la integridad del DNA mediante el test SCD, en microscopía de campo claro (a-e) y microscopía de fluorescencia (a'-e'). Los espermatozoides etiquetados como a y b, tienen su DNA íntegro, el resto presentan DNA fragmentado (Cortés-Gutiérrez et al., 2007).



disulfuro y se utiliza una solución específica de lisis para extraer proteínas, los bucles se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual. Los espermatozoides con el DNA fragmentado no sueltan o ven impedida la liberación de los bucles de DNA, mostrando halos muy reducidos o ausencia de los mismos (Fernández et al., 2003).

Debido a su sencillez y no requerimiento de ningún equipamiento no convencional se ha extendido su uso como prueba de rutina en el estudio de la fragmentación de DNA espermático en los laboratorios básicos de andrología.

### **Sperm chromatin structure assay (SCSA).**

Esta técnica fue desarrollada por Evenson et al. hace 20 años (Evenson et al., 1980), y se viene considerando como el referente para el análisis de la fragmentación del DNA en el espermatozoide. Su aplicación está relativamente extendida en humanos y también ofrece buenos resultados en animales utilizados para explotación ganadera, tales como ganado porcino, bovino y ovino (Evenson et al., 2007). Es la técnica que se ha utilizado como referencia en este trabajo.

El principio en el que se sustenta la técnica es que la cromatina que presenta DNA fragmentado tiene mayor susceptibilidad para ser desnaturalizada *in situ* tras aplicar un tratamiento con calor o una solución ácida. La segunda parte de la metodología se fundamenta en las características metacromáticas de la naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de DNA como un monómero, que al ser excitado emite color verde, pero que presenta emisión en color rojo-anaranjado si se incorpora al DNA de cadena sencilla. Las células así teñidas se someten a citometría de flujo para discriminar entre ambos tipos de color (Hoshi et al., 1996).

Esta técnica es la más aceptada para establecer correlaciones entre fragmentación de DNA y fertilidad de un individuo. El grupo del Dr. Evenson ha establecido que individuos con un porcentaje de fragmentación en su DNA de alrededor de un 30% o superior, presentaría problemas de fertilidad (Evenson, 1999).

Las ventajas del uso de SCSA son:

- 20 años de experiencia trabajando con la técnica que han dado como resultados numerosos estudios en humanos y animales.
- Alícuotas de las mismas muestras de semen utilizadas en técnicas de reproducción asistida pueden ser fácilmente congeladas y almacenadas, para que tiempo después se pueda analizar mediante SCSA. Así se puede obtener pronósticos de fertilidad antes de conocer la fertilización en las técnicas de reproducción asistida in vivo.
- De 5.000 a 10.000 espermatozoides son analizados en el citómetro en menos de 5 minutos, proporcionando resultados objetivos y un alto nivel de repetitividad (0,98 – 0,99) en comparación con otros parámetros evaluados en el semen.
- Los datos proporcionados sobre la infertilidad masculina tienen una razonable sensibilidad, alta precisión y un umbral estadístico sobre el pronóstico de fertilidad masculina (Evenson et al., 2002).

El inconveniente que tiene esta tecnología es que no es accesible a la mayoría de los laboratorios, al fundamentarse en la utilización de la citometría de flujo (Cortés-Gutiérrez et al., 2007).

### **3.6. Aplicación del análisis mediante SCSA.**

Se han realizado estudios en numerosas especies:

Bovino:

Independientemente de la causa de la desestabilización de la cromatina, se ha comprobado que la estabilidad varía mucho entre diferentes muestras, y se ha asociado a una pérdida de fertilidad. El método de SCSA es una herramienta muy valiosa para la evaluación del semen y pronosticar la fertilidad de un toro e identificar a los machos con una fertilidad subóptima (Figura 4) (Ballachey et al., 1987).

En otro estudio (Januskauskas et al., 2003), se comprobó que la detección de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de los espermatozoides tras la congelación estaba inversamente relacionado con la viabilidad de las células, y directamente relacionado, con la desestabilización de la cromatina (evaluada por la

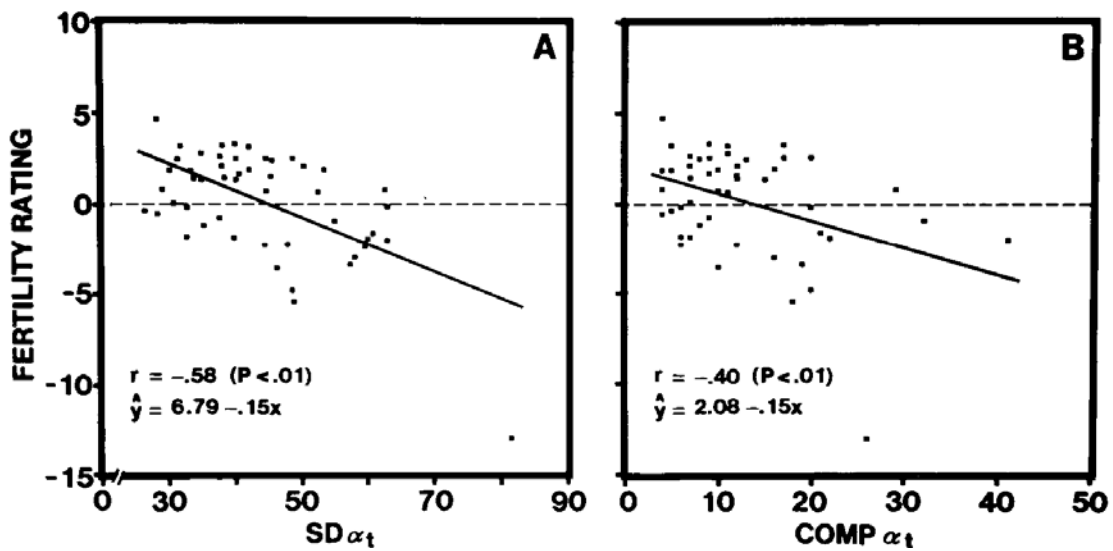


Figura 4. Relación entre la tasa de fertilidad y  $SD\alpha_t$  (actualmente denominado SDDFI, A) y  $COMP\alpha_t$  (células fuera de la población principal, B) en muestras de toro analizadas mediante SCSA (Ballachey et al., 1987). Al aumentar los valores de SDDFI y COMP disminuye la tasa de fertilidad de los toros.

técnica SCSA). La expresión de la fosfatidilserina en células vivas indica una alteración que conduce a la muerte celular. La presencia de correlaciones significativas indica que las alteraciones en la espermatogénesis que afectan a la estructura de la cromatina espermática (compactación) también pueden hacerlos susceptibles a la alteración de la membrana.

Cerdo:

Se han realizado estudios en los que el objetivo era predecir la fertilidad de los cerdos mediante el método SCSA. El sistema SCSA dividió un grupo de cerdos en dos subgrupos, uno de ellos donde incluía animales con alto potencial reproductivo y otro con cerdos con bajo potencial (Figura 5). Para comprobar estos datos, se cubrieron cerdas con estos machos, y las camadas corroboraron las predicciones realizadas por SCSA (Evenson et al., 1994).

Table 2. Heterospermic trial data for each boar

Boar	No. of litters	Total no. of piglets in litters	Expected no. of offspring	Actual no. of piglets sired	Percentage of the theoretical estimate
1	14	164	54.7	14	26%
2	8	102	34.0	63	185%
3	4	42	14.0	7	50%
4	5	62	20.7	10	48%
5	6	59	19.7	27	137%
6	5	57	19.0	40	210%

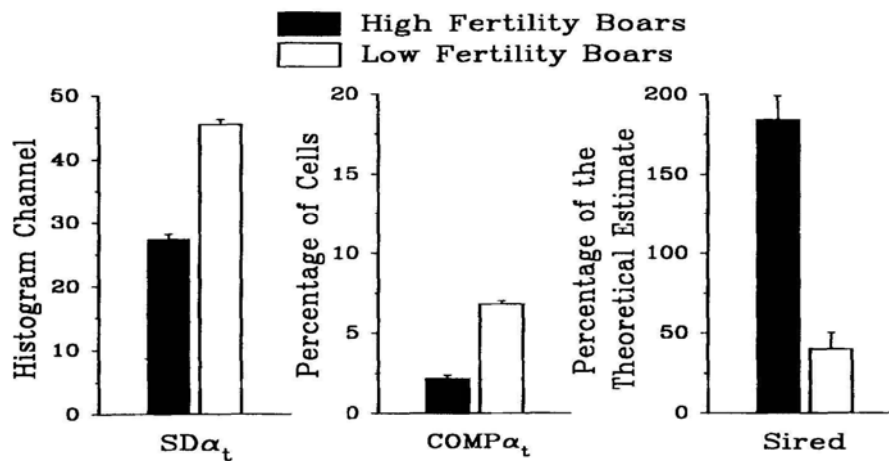


Figura 5. Comparación de los  $SD\alpha_t$  (actualmente denominado SDDFI) y COMP, tras analizar muestras de semen de cerdo con la técnica SCSA. Se compararon dos grupos de cerdos, uno con alto potencial de fertilidad y otro con bajo potencial (Evenson et al., 1994). Los cerdos incluidos en el grupo de bajo potencial de fertilidad presentan valores mayores de los índices estudiados en comparación con el grupo de alto potencial.

Ovino:

En esta especie se han hecho numerosos estudios. Se ha visto que la criopreservación del semen facilita la alteración del DNA de los espermatozoides (Peris et al., 2007). La baja a moderada correlación entre las variables proporcionadas por SCSA y los parámetros medidos mediante métodos clásicos de evaluación seminal indican que la técnica de SCSA proporciona información adicional a las pruebas estándar para evaluar la calidad del semen de los carneros (Peris et al., 2004).

Ciervo:

En pequeños rumiantes se ha utilizado el ciervo rojo como modelo experimental. Se ha comprobado que oxidantes como el  $Fe^{2+}$ /ascorbato y el  $H_2O_2$  inducen la producción de ROS intracelular y, según la concentración de los oxidantes se produce mayor o menor cantidad de ROS. Cuando la concentración de ROS es baja no producen una disminución de la calidad espermática, lo contrario que sucede con las altas concentraciones. El daño en la cromatina del espermatozoide se estudió mediante SCSA, y no se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos oxidantes (Martínez-Pastor et al., 2009).

### **3.7. Encuadre del estudio y análisis del DNA mediante qPCR.**

Este trabajo se encuadra en una línea de investigación que tiene como objetivo analizar el daño en el DNA mediante el uso de herramientas de biología molecular. La técnica de SCSA es una técnica validada, por lo cual se planteó como referencia para validar los resultados obtenidos de la qPCR. En un futuro, se analizarán las muestras mediante qPCR. Y los resultados de este experimento servirán como referencia.

La qPCR es una herramienta utilizada para medir el daño y reparación del genoma nuclear o mitocondrial. Esta técnica detecta y cuantifica el daño y reparación en el DNA. Ha sido utilizada con diferentes especies, pero pocas veces para cuantificar el daño en el DNA espermático. Se basa en la amplificación del DNA con DNA polimerasas y la cuantificación del producto mediante fluorescencia (real time). Cualquier daño en el DNA capaz de detener o inhibir significativamente la DNA polimerasa se traduce en una reducción de la amplificación (Meyer, 2010).

Las ventajas de esta técnica son que se requiere muy poca cantidad de muestra. Tiene buena reproducibilidad y cuantificación, y se adapta a un gran número de especies. Entre los inconvenientes de esta técnica se encuentra su límite de detección, una lesión por  $10^5$  bases, la incapacidad de diferenciar los distintos tipos de daño en el DNA, y la necesidad de contar con una muestra de referencia o control para cuantificar el daño (Meyer, 2010).

El presente estudio se encuentra dentro de una línea de investigación, en la cual la técnica SCSA será la técnica de referencia. Y se analizará el daño del DNA de los espermatozoides de carnero mediante qPCR.

## 4. Hipótesis y objetivos.

El presente trabajo se planteó dentro de una línea experimental que tiene como objetivo poner a punto el análisis del DNA espermático en pequeños rumiantes mediante qPCR "real time". La técnica de SCSA es una técnica validada, por lo cual se planteó como referencia para evaluar los resultados de SCSA obtenidos de la qPCR.

Dado que el estrés oxidativo causa daños en el DNA, pero distintos tipos de oxidantes tienen efectos diferentes en la fisiología espermática, consideramos someter a muestras espermáticas de carnero a distintos tratamientos oxidantes. Estas muestras, presuntamente con distintos grados de daño, se evaluarían mediante SCSA, para determinar la fragmentación del DNA.

Por lo tanto, se plantearon los siguientes objetivos para el trabajo:

1. Someter a muestras espermáticas de carnero a los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ),  $Fe^{2+}$ /ascorbato y reactivo de Fenton ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ ), a diferentes concentraciones y durante distintos tiempos, con el fin de obtener distintos grados de daño en el DNA espermático.
2. Evaluar mediante SCSA y citometría de flujo el DNA espermático, obteniendo mediante esta técnica una estimación de la fragmentación del DNA y otras alteraciones de la cromatina.
3. Obtener y conservar parte de cada muestra para una eventual extracción de DNA y su análisis mediante qPCR "real-time".

## **5. Material y métodos.**

### **5.1. Diseño experimental.**

En este trabajo sometimos las muestras espermáticas a varios tratamientos oxidativos, con el fin de estimar el daño inducido en el ADN. Para ello, suplementamos las muestras con tres agentes oxidantes a diferentes concentraciones, y las incubamos durante varias horas, muestreando a tres tiempos.

Los agentes oxidantes fueron el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a 1 mM, 10 mM y 100 mM,  $Fe^{2+}$ /ascorbato y  $Fe^{2+}/H_2O_2$  (reactivo de Fenton) a 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1 mM. Se muestrearon a las 3, 6 y 24 h de incubación.

### **5.2. Animales utilizados.**

En este estudio se utilizaron tres moruecos adultos de raza Assaf de edades comprendidas entre 1 y 6 años, adiestrados para la recogida seminal mediante vagina artificial.

Las muestras de semen fueron obtenidas en el mes marzo, durante la época no reproductiva de las ovejas.

Los machos se encuentran en el Centro de Selección de la Raza Assaf ubicado en la localidad de San Pedro Bercianos, perteneciente a la Excm. Diputación Provincial de León. Estos sementales proceden de las explotaciones integrantes del núcleo de selección y mejora de la raza. El régimen de explotación es intensivo y la alimentación se basa en forraje (alfalfa y paja) y concentrado de alta calidad.

### **5.3. Recogida y procesado del semen.**

Para este estudio se recogieron tres eyaculados, uno de cada macho. Los eyaculados se recogieron el mismo día. La recogida del semen se realizó en presencia de una hembra señuelo, utilizando una vagina artificial llena de agua a 40 °C y con una presión y lubricación idóneas para la recogida (Figura 6). El semen se recogió en un colector de vidrio graduado, que se pasó a un baño a 34 °C justo después de la



eyaculación. Tras la recogida del semen, se realizó una valoración previa del volumen, movilidad masal y concentración seminal.

El volumen se estimó a partir de la escala del tubo colector. Para determinar la movilidad masal, se depositó una gota de semen sobre un portaobjetos de vidrio, y se observaron las olas del movimiento espermático con un microscopio Nikon Labophot (Nikon, Tokio, Japón), colocando el portaobjetos sobre una pletina termorregulada a 37 °C y observando la gota a 40 aumentos en campo claro. La escala de valoración del movimiento masal utilizado comprende desde 0 (sin movimiento) hasta 5 (olas de movimiento muy rápidas).

La concentración se determinó mediante espectrofotometría. Para ello se diluyeron 25 µl de semen en 10 mL de una solución de citrato de sodio isoosmolar (30,4 g/l de citrato de sodio; 320 mOsm) y se determinó la transmitancia en un espectrofotómetro Spectronic 20, calibrado a 540 nm (Baush+Lomb; Rochester, NY, USA). Mediante una tabla de referencia que correlaciona transmitancia con la concentración del eyaculado, se obtuvo el valor de la concentración del eyaculado (millones de espermatozoides por mL).

Los eyaculados utilizados en el experimento fueron aquellos cuyo volumen fue superior a 0,5 mL, con una movilidad masal mayor o igual a 4 y con una concentración mayor de 3000 millones de espermatozoides por mililitro. Los eyaculados válidos fueron mezclados y diluidos con el mismo volumen de diluyente de congelación (TES 218 mM, Tris 58 mM, Fructosa: 11 mM, 10% yema de huevo clarificada y 4% glicerol) (Anexo I, tabla 1). Se transportaron al laboratorio a 5 °C dentro de las 2 h siguientes a la dilución del eyaculado (Figura 7).

#### **5.4. Congelación de las dosis seminales.**

Al llegar al laboratorio, se determinó la concentración espermática del pool. La concentración espermática se midió tras fijar las muestras en glutaraldehído al 2% (glucosa 0,16 mM, citrato de sodio 0,03 mM, bicarbonato de sodio 0,02 mM y Agua milli-Q) (dilución 1:60) (Anexo I, tabla 6). Se cargó la muestra en un hemocitómetro

Bürker y se contaron los espermatozoides de un volumen concreto a 200 aumentos (microscopio de contraste de fases Labophot-2; Nikon, Tokio, Japón).

El pool se diluyó a 100 millones de espermatozoides por mililitro con el mismo diluyente de congelación, y se dejaron equilibrando 2 h a 5 °C. Tras el equilibrado, las muestras se empaquetaron en pajuelas de polivinilo de 0,25 mL y se sellaron con PVA (alcohol de polivinilo). El PVA polimeriza con la humedad, formando un tapón plástico. El material de congelación se compró a Minitube Ibérica (Tarragona, España).

Las pajuelas se colocaron en gradillas metálicas específicas para congelación de pajuelas. Las gradillas se introdujeron en un biocongelador programable Kryo 10 Series III (Planer plc., Sunbury-On-Thames, UK). Este biocongelador utiliza vapores de nitrógeno líquido para disminuir la temperatura a una velocidad determinada. Se utilizó una rampa de congelación de -20 °C/min, optimizada para semen de carnero. Al llegar a -100 °C, el biocongelador quedó a la espera. Las pajuelas se transfirieron directamente a nitrógeno líquido, y se almacenaron en un tanque en la fase líquida del nitrógeno líquido (Figura 8).

#### **5.5. Preparación de las muestras para el experimento.**

La descongelación se llevó a cabo mediante inmersión de seis pajuelas en agua a 37 °C durante 30 segundos. Las pajuelas se secaron, y su contenido se echó en un tubo de 1,5 mL. Tras 10 min, se añadieron 0,5 mL de medio TALP-Hepes (Anexo I, tabla 5) y se centrifugó el tubo a 300×g durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de TALP-Hepes, quedando la concentración espermática a 100 millones de espermatozoides por mililitro. Se distribuyó la muestra en 10 tubos de 1,5 mL, y se añadió a cada uno 300 µL de TALP-Hepes, quedando las muestras a 25 millones de espermatozoides por mililitro (Figura 9).

#### **5.6. Preparación de los oxidantes.**

Las diluciones de peróxido de hidrógeno se prepararon a partir de una solución stock de 1 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Anexo I, tabla 3) (1/10 de la solución al 30% del laboratorio, 10 M) en 10 mL de agua.

Las diluciones de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato se prepararon a partir de una solución stock de 10 mM de  $\text{FeSO}_4$  y 100 mM de ascorbato sódico (Anexo I, tabla 2); diluimos 27,8 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  y 198,2 mg de ascorbato de sodio en 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q.

Por último, las diluciones de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  se prepararon a partir de una solución stock de 10 mM de  $\text{FeSO}_4$  y 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Anexo I, tabla 4); diluimos 13,9 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  y 50  $\mu\text{L}$  del stock de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 5 mL.

A continuación, se prepararon una dilución seriada de los stocks  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  1/10 y 1/100 en agua. Todas las diluciones de los diferentes agentes oxidantes, se prepararon el mismo día del experimento.

### **5.7. Preparación de las muestras con los oxidantes.**

Añadiendo las soluciones oxidantes a las muestras espermáticas, obtuvimos las diferentes concentraciones de los agentes oxidantes, como se indica en la tabla 2.

Se recogió la primera muestra a las 0 h, solo del control sin oxidantes.

A continuación, se colocaron los tubos a 37 °C y a las 3, 6 y 24 horas se muestrearon todos los tubos SCSA y DNA (Figura 9).

Para SCSA, se tomó una alícuota de 32  $\mu\text{L}$  y se diluyó en 400  $\mu\text{L}$  de TNE en criotubos ( $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ). Las muestras se congelaron y se conservaron a -80 °C. El TNE (Tris/NaCl/EDTA) es un medio tamponado que se utiliza para diluir las muestras seminales antes de congelarlas. El TNE está formado por Tris- HCl 100 mM, NaCl 1,5 M, EDTA disódico 10 mM todo ello disuelto en agua milli-Q. Ajustado el pH a 7,4 con NaOH 2 N (Anexo I, tabla 7).

Tabla 2. Adicción de las soluciones oxidantes a las muestras espermáticas, para obtener las concentraciones de los agentes oxidantes.

	Control	Fe <sup>2+</sup> 10 µM	Fe <sup>2+</sup> 100 µM	Fe <sup>2+</sup> 1 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 mM	Fe <sup>2+</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 µM	Fe <sup>2+</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 µM	Fe <sup>2+</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM
<b>Stock (µL)</b>	0	15 µL de stock 1/100	15 µL de stock 1/10	15 µL de stock 10 mM	15 µL de stock 1/100	15 µL de stock 1/10	15 µL de stock 1M	15 µL de stock 1/100	15 µL de stock 1/10	15 µL de stock 10 mM

En el mismo momento que se tomaron las muestras para realizar SCSA, se tomaron muestras para realizar qPCR. Se tomó un volumen de 1 millón de espermatozoides (40 µL), que se diluyó en 200 µL de TNE. Los tubos se conservaron a -80 °C. Estas muestras no se utilizaron en este experimento, sino en el siguiente experimento dentro de la misma línea de investigación.

## 5.8. Análisis mediante SCSA.

### Preparación de las soluciones para SCSA.

Para el SCSA se prepararon con antelación el medio detergente- ácido y la solución de tinción.

El medio detergente ácido se utiliza para preparar las muestras antes de teñirlas con la solución de tinción con naranja de acridina. El detergente permeabiliza las membranas de los espermatozoides y el pH bajo desnaturaliza el DNA donde la cromatina es más laxa o la doble hebra está rota.

Está compuesto por NaCl 150 mM, Triton X- 100 0,1% v/v, HCl 2 N 80 mM disuelto en agua milli- Q, ajustando el pH a 1,2 (Anexo I, tabla 8). Para 200 mL, se añadieron 1,75 g de NaCl, 200 µL de Triton X-100 y 8 mL de HCl 2 N, se ajustó el pH hasta 1,2 con HCl 5 N y se almacenó a 4 °C. Se puede almacenar varios meses a esta temperatura.

La solución de tinción consta de NaCl 150 mM, Ácido cítrico 100 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM y EDTA disódico 1 mM disuelto en agua milli- Q y naranja de acridina de alta

pureza Polysciences 0,02 mM. El pH se ajusta a 6 con NaOH concentrado (Anexo I, tabla 9).

Preparamos 500 mL, se diluyeron 4,383 g de NaCl, 9,606 g ácido cítrico, 14,196 g de NaHPO<sub>3</sub> y 0,186 g de EDTA disódico dihidrato en 480 mL de H<sub>2</sub>O. Se ajustó el pH y se añadió el stock de 3 mL de naranja de acridina.

### **Realización de la técnica.**

El SCSA es un método que determina la susceptibilidad del DNA espermático a la desnaturalización (Love, 2005). Esta técnica utiliza un colorante metacromático, naranja de acridina (AO), y la citometría de flujo (Evenson and Jost, 2000). El naranja de acridina emite fluorescencia de color verde cuando se une a DNA de doble hebra, y de color rojo cuando se une a DNA de hebra sencilla. Se calcula un ratio para cada espermatozoide entre la fluorescencia roja y la fluorescencia total (verde+roja) que es el llamado DFI (DNA fragmentation index). A partir de este índice, se puede estimar el daño en el DNA de los espermatozoides (Evenson et al., 2002).

El análisis se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San Jose, CA, USA). Los datos correspondientes a la fluorescencia roja se captan con el fotodetector FL3, que tiene un filtro de paso largo 670. Y la fluorescencia verde se adquiere con el fotodetector FL1, que tiene un filtro 530/28.

Para analizar las muestras es necesario tener muestras estándar preparadas y crear una plantilla de adquisición en el software de citometría. La muestra estándar es una muestra con alta heterogeneidad de DFI (DNA Fragmentation index), que se preparó como las muestras a analizar.

La plantilla se creó una gráfica de puntos xy, con FL3-H (670LP, rojo) en el eje x y FL1-H (530/28BP, verde) en el eje y. Se utilizó una escala lineal con ambos ejes (0-1023). Se dibujó una región que excluyera las regiones donde aparezcan señales de debris, bacterias o células aglutinadas (señales en el canal 1023 de x o y). Esta región excluye los extremos de cada eje (~ canal 1000), el origen de ejes (línea de ~ 45°), la región a la derecha de la población principal de células y la región <50 en el eje y.

Se configuró el software para detener la adquisición al llegar a 5.000 eventos en la región anterior y para guardar sólo esos eventos.

Se creó un gráfico de puntos FSC-H vs. SSC-H para asegurarse de que se estaban adquiriendo correctamente los eventos correspondientes a espermatozoides, y ajustar el umbral de FSC-H para eliminar el ruido (típicamente  $\sim 350$ , para no eliminar espermatozoides).

Una vez tuvimos las muestras estándar y la plantilla se comenzó con el análisis, es importante mantener la solución detergente-ácida y la solución de tinción en hielo húmedo.

La muestra estándar se descongeló en agua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , una vez descongelada, comprobando que no hubiese restos de hielo, se transferían  $200\text{ }\mu\text{L}$  de la muestra al tubo de citometría, a continuación, se añadieron  $400\text{ }\mu\text{L}$  de la solución detergente-ácida y exactamente a los 30 segundos se añadieron  $1,2\text{ mL}$  de la solución de tinción (Figura 10). A continuación, se colocó el tubo en el citómetro, tras 2 minutos de tinción, se comenzó la adquisición en modo setup (sin guardar los datos), se ajusta la región de adquisición para excluir debris y no excluir células, y la velocidad de flujo del citómetro a  $200\text{-}250\text{ células/s}$ , una velocidad de flujo baja. Se ajustaron los voltajes de los fotomultiplicadores FL1 y FL3:

FL1- H para un valor medio de  $y$  de  $130 \pm 5$ .

FL3- H para un valor medio de  $x$  de  $500 \pm 5$ .

Para evaluar las muestras de semen, se siguió el mismo protocolo que para la muestra estándar, pero sin modificar el voltaje de los fotodetectores.

### **5.9. Análisis estadístico.**

El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico R (v. 2.15.0). Las variables del SCSA se analizaron mediante modelos lineales de efectos mixtos. Se analizó por una parte el efecto del tiempo de incubación, utilizando solo los datos de los controles, utilizando el tiempo como factor fijo. En un segundo análisis, dentro de cada muestreo de 3, 6 y 24 h, se analizó el efecto de los tratamientos oxidantes frente

al control de cada tiempo. Se obtuvo una estimación del efecto de cada tiempo y cada tratamiento, y se consideró un efecto significativo (incrementar o disminuir el valor de la variable respecto al control respectivo) cuando  $P < 0,05$ .

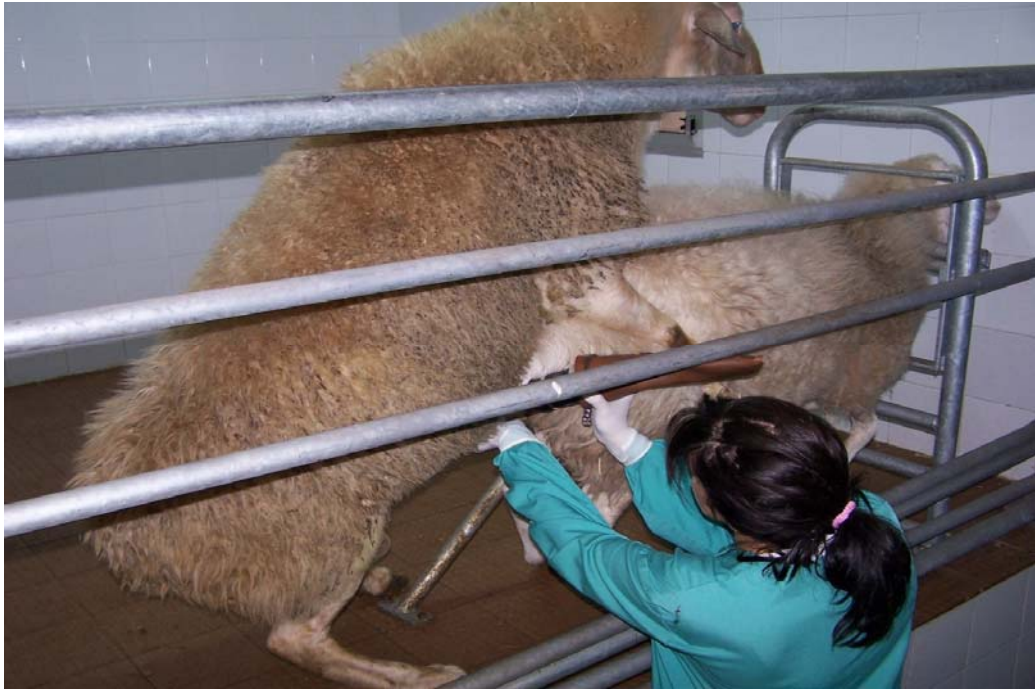


Figura 6. Fotografía del momento de la extracción seminal.

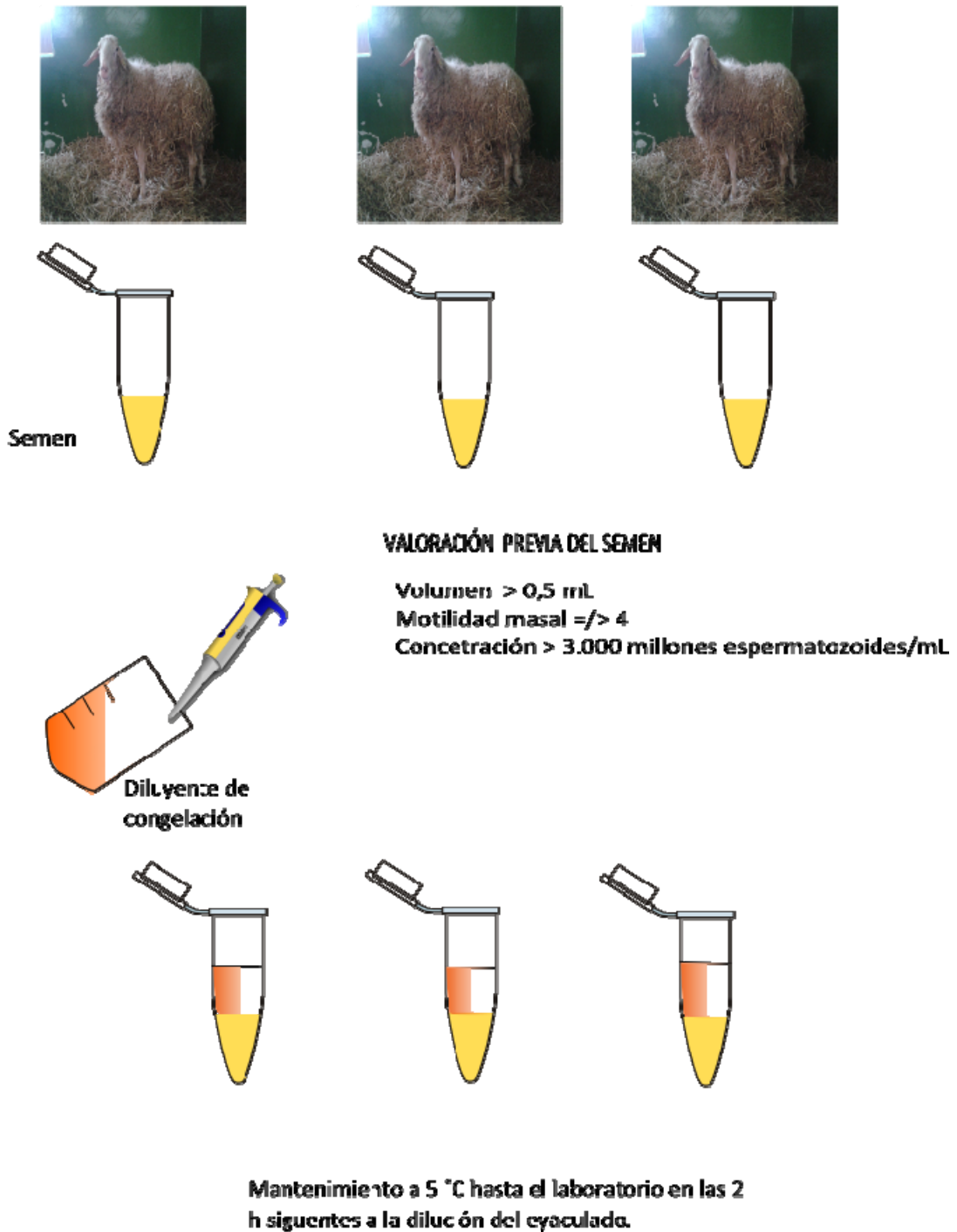
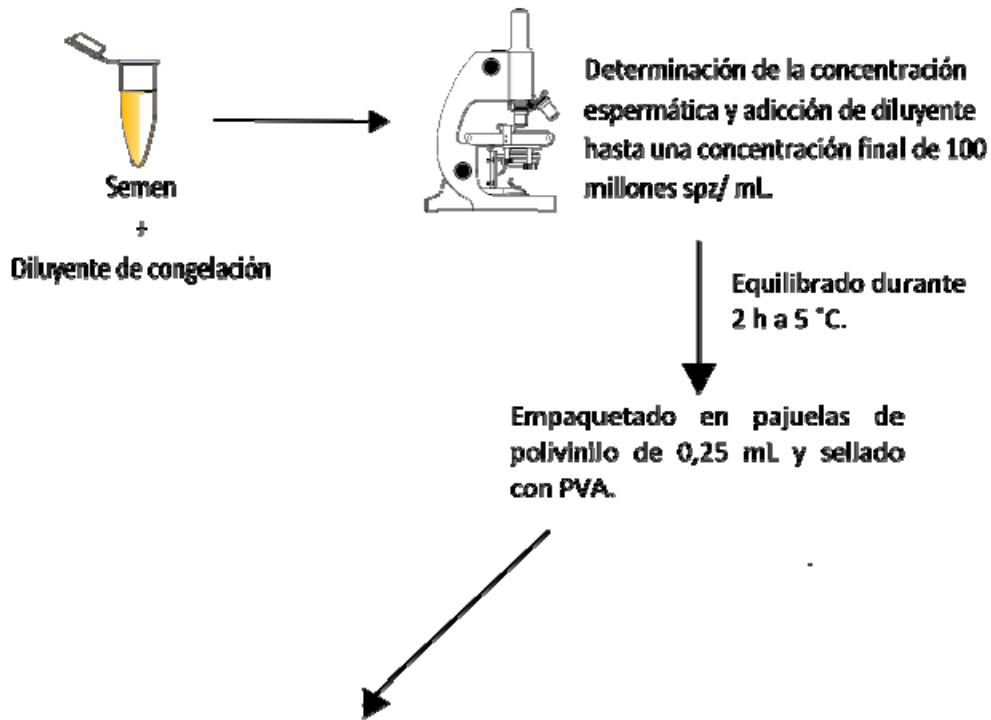
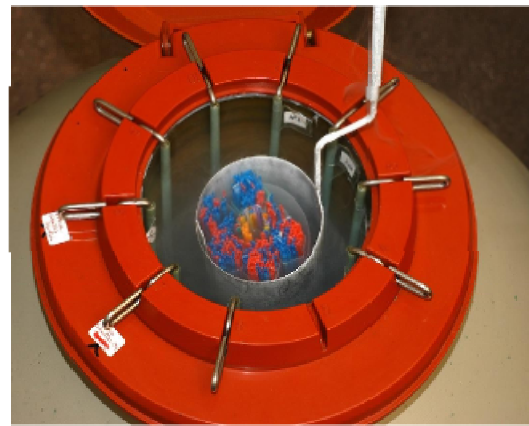


Figura 7. Recogida y procesado del semen. Se recogieron tres eyaculados de diferentes machos. A continuación, se realizó una valoración previa del volumen, movilidad masal y concentración seminal. Los eyaculados válidos se mezclaron y diluyeron con el mismo volumen de diluyente de congelación. Se transportaron al laboratorio a 5 °C dentro de las 2 h siguientes a la dilución de los mismos.





**Congelación de las pajuelas (-20°C/min hasta -100 °C) en el biocongelador programable.**



**Transferencia de las pajuelas al nitrógeno líquido.**

Figura 8. Congelación de las dosis seminales. En el laboratorio se determinó la concentración espermática de las muestras. A continuación, se diluyó a 100 millones de espermatozoides/ mL con diluyente de congelación, y se dejaron equilibrar durante 2 h a 5 °C. Después se empaquetaron en pajuelas de 0,25 mL, y se introdujeron en gradillas en un biocongelador programable. En el congelador alcanzaron los -100 °C y se transfirieron directamente a nitrógeno líquido.

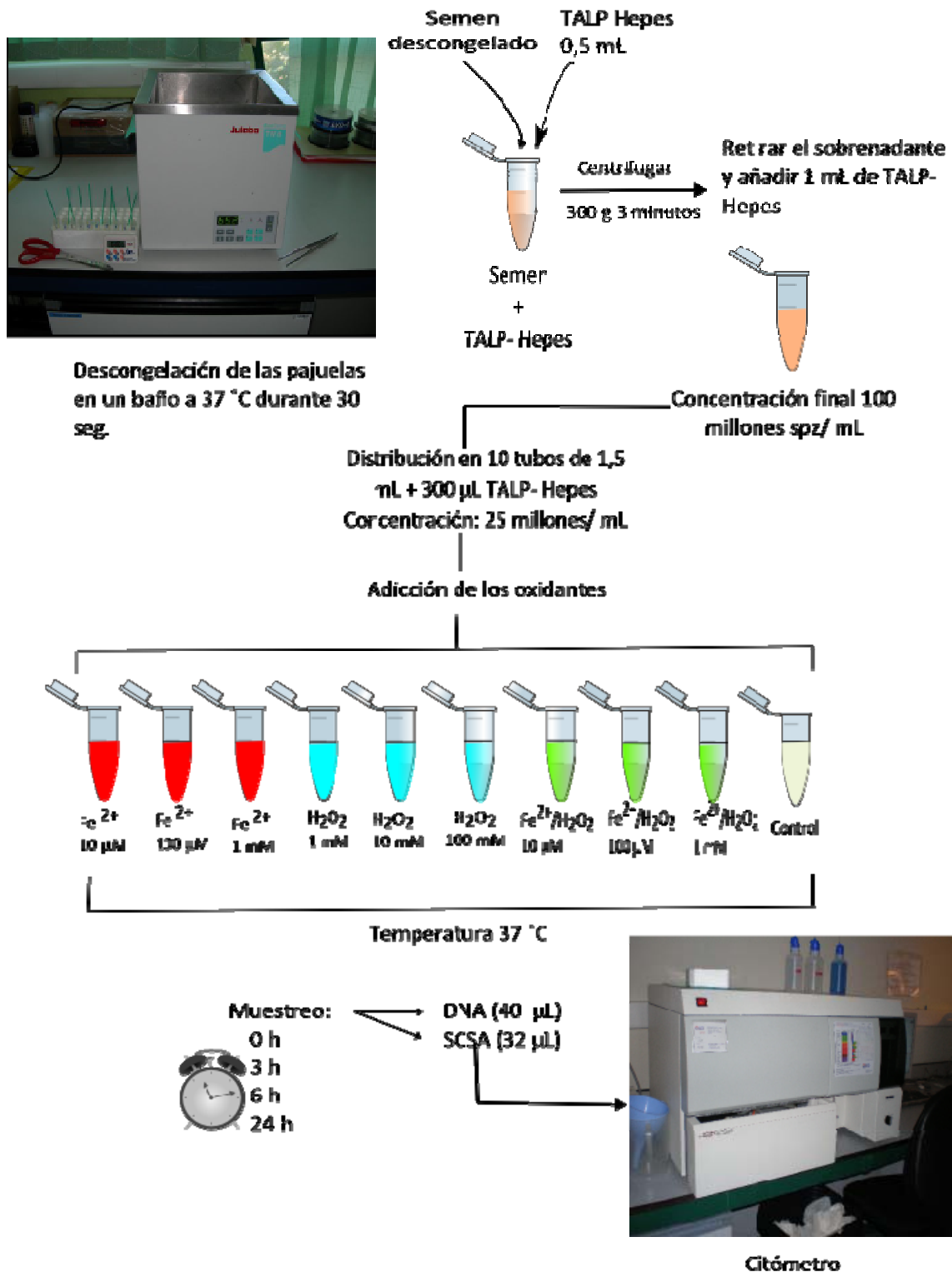


Figura 9. Las pajuelas se descongelaron en agua a 37 °C durante 30 segundos. El contenido se depositó en un tubo y se añadió 0,5 mL de TALP- Hepes y se centrifugó a 300xg durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de TALP- Hepes. La muestra se distribuyó en 10 tubos y se añadió 300 µL de TALP- Hepes, quedando las muestras a 25 millones de spz/mL. Cada muestra se sometió a un oxidante y concentración diferente. Se incubaron a 37 °C y se recogieron muestras a las 0 (control), 3, 6 y 24 horas. Posteriormente, se evaluó el daño en el DNA espermático mediante SCSA y qPCR.



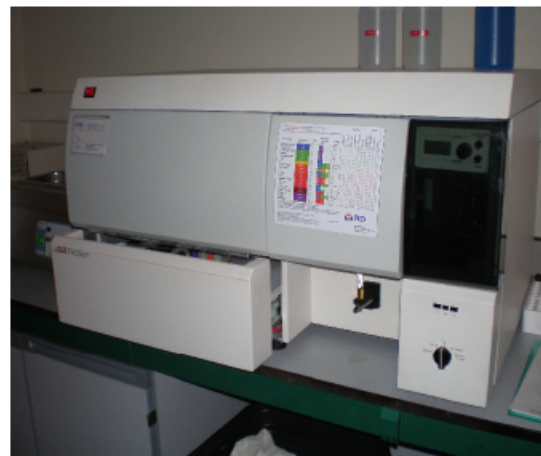
**Muestras congeladas**



**Descongelación de las  
muestras a 37 °C**



**200  $\mu$ L de la muestra + 400  $\mu$ L del  
detergente durante 30 seg después  
1,2 mL de a sol. de tinción**



**Análisis en el  
citómetro**

Figura 10. Realización de la técnica SCSA. Se parte de las muestras congeladas (fotografía superior izquierda) que son descongeladas en un baño de agua a 37 °C (fotografía superior derecha). A continuación se le adicionaron 200  $\mu$ L de solución detergente-ácida, durante 30 segundos y después 1,2 mL de la solución de tinción (fotografía inferior izquierda). A los dos minutos de tinción, se pasaron las muestras por el citómetro (fotografía inferior derecha).

## 6. Resultados.

El ajuste del citómetro para las muestras de carnero se realizó sin problemas. Durante la realización de los análisis, se mantuvo la rutina de analizar una muestra estándar cada 10 tubos experimentales, tal como recomiendan Evenson y Jost (Evenson and Jost, 2000). Los cambios realizados a los voltajes de los fotomultiplicadores durante el análisis de los tubos de muestra estándar fueron mínimos. Esto se tomó como prueba de la estabilidad del sistema óptico e hidrodinámico del citómetro. Se definió la adquisición del citómetro de flujo y los parámetros y regiones de análisis en el software, incluyendo todos las señales de los espermatozoides y excluyendo la señales de debris del análisis, localizadas en el inicio de los ejes X e Y de los citogramas. Y se equilibró el citómetro dejando pasar durante 15 minutos un buffer de equilibrio con naranja de acridina (Evenson and Jost, 2000).

En el análisis de las muestras de SCSA, se obtuvieron los resultados esperados. Pudimos detectar fluorescencia verde y roja en los espermatozoides tratados para SCSA. Encontramos, tal como está descrito en otros trabajos (Evenson and Jost, 2000; Evenson et al., 2002) una población principal con la cromatina no alterada (incremento de la fluorescencia verde sobre la roja) a la izquierda y, a la derecha de la línea diagonal de trazos, las células fuera de esta población (COMP) con la cromatina alterada (incremento de la fluorescencia roja sobre la verde) aunque COMP fue casi inexistente en casi todas las muestras. Los eventos por encima de la línea horizontal formaron parte de HDS (proporción de espermatozoides con alta tinción de DNA, posiblemente con cromatina laxa). Tras calcular DFI, obtuvimos un histograma típico, distinguiéndose el pico de la población principal y las células con DFI más alto formando una prolongación a la derecha.

En la Figura 11 se muestran dos citogramas de ejemplo obtenidos un trabajo de Evenson et al.(2002) , donde se comparan los resultados clínicos obtenidos con SCSA de dos pacientes, uno fértil y otro no. En los citogramas de la derecha se observa que el número de células fuera de la llamada población principal (COMP), es mayor en el caso del paciente infértil. En el histograma DFI, se observa que en el caso del paciente

fértil hay un pico correspondiente a la población principal y no hay prolongación hacia a la derecha. Al contrario que en el paciente infértil, en el cual, el pico correspondiente a la población principal es menor. Y las células con un DFI más elevado forman una prolongación hacia la derecha. En nuestras gráficas se observó que la mayoría de los tratamientos no presentaron células fuera de la población principal. Y solamente algunos tratamientos mostraron como resultados citogramas similares al paciente infértil. Es el caso de las muestras tratadas con 1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato incubada durante 3 h (Anexo II, citograma A5).

En la Figura 12 se muestran dos ejemplos representativos de nuestros análisis, en los cuales se replican las gráficas mostradas en la Figura 11 y se muestra el paralelismo entre los resultados de Evenson en semen humano y nuestros resultados con semen de carnero. En nuestras gráficas observamos que en el caso de semen tratado con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato a 1 mM incubado durante 3 h muestra un aumento de la población con la cromatina alterada (incremento de la fluorescencia roja sobre la verde), en comparación con el semen tratado con 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 3 h, en la cual no observamos apenas población con la cromatina alterada. Si nos centramos en el citograma central, que enfrenta los valores de DFI con los valores de fluorescencia total, se observa que en el caso de los tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  la población se encuentra por debajo del DFI 25%. Por el contrario, en los tratados con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato encontramos una población que se encuentra entre el 25% y el 50%, que correspondería al mDFI. Por último, en el histograma de DFI, en relación con los anteriores, se distingue un pico con la llamada población principal, encontrándose las células con un DFI más elevada formando una prolongación hacia la derecha, lo cual es evidente en el caso del tratamiento con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato (que llegó a formar un segundo pico en muestras con mayor daño) (Anexo II, citogramas A5, A15 y A25). En el caso del tratamiento con peróxido de hidrógeno, y en otras muestras que apenas presentan fragmentación, solamente encontramos el pico con la población principal, sin prolongación a la derecha.

En el Anexo II se muestran los datos obtenidos del análisis de citometría de flujo. Sin necesidad de analizar los datos, pudimos observar que las muestras Control apenas

sufrieron cambios con el tiempo. En cuanto a las muestras experimentales, hubo un acusado contraste entre aquellas tratadas con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato y el reactivo de Fenton. En las tratadas con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato se observó una clara respuesta con dosis crecientes, que se hizo evidente en cada tiempo de muestreo. La muestra tratada con 10  $\mu\text{M}$  apenas sufrió cambios (Anexo II, citogramas A3, A13 y A23), mientras que la tratada con 1 mM tuvo un cambio moderado a 3 h (Anexo II, citograma A5), y muy evidente en tiempos posteriores. De hecho a 24 h desapareció la población principal (Anexo II, citograma A25). Las muestras incubadas durante 6 h mostraron modificaciones intermedias (Anexo II, citograma 15). La nube de puntos se fue modificando a medida que aumento el tiempo de incubación. La nube de puntos fue formando una prolongación hacia a la derecha, hasta que finalmente, a las 24 h, desapareció la población principal (Anexo II, citograma A25). En los histogramas de DFI se pudo apreciar como en la muestra tratada con 1 mM e incubada durante 3 h, se observaron dos picos, el de la izquierda, el pico de la población principal y a la derecha, las células con el DFI más elevado (Anexo II, citograma A5). En el histograma de la muestra incubada durante 24 h, desapareció el pico de la población principal y se observó solamente un pico con el DFI entre 25-50% (Anexo II, citograma A25). A las 6 h, el pico se encontró entre 25%- 40% de DFI (Anexo II, citograma A15).

En cambio, en las tratadas con el reactivo de Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ), no hubo cambios evidentes con el tiempo, y en su mayor parte, los citogramas no se diferenciaron de las muestras Control (Anexo II, citogramas 11, 21 y 31).

En el caso del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se observaron pocos cambios en los citogramas respecto a las muestras Control. Solo en el caso de 100 mM se pudo observar cambios que indicaron un incremento del daño al DNA espermático, y sobre todo en las muestras de 24 h (Anexo II, citograma A28). Tenemos que tener en cuenta que las dosis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizadas son dos órdenes de magnitud mayores que las utilizadas con los otros dos tratamientos oxidantes.

Una vez procesados los datos de fluorescencia, obtuvimos los seis parámetros que utilizamos para definir el daño en el DNA espermático. El primero de los parámetros es el DFI (Índice de fragmentación del DNA), es el ratio entre la

fluorescencia roja/fluorescencia total. El SDDFI es la desviación estándar del DFI, e indica heterogeneidad en la muestra. El DFI se divide en el mDFI y el hDFI. El mDFI es el porcentaje de espermatozoides con el DFI mayor del 25% y menor del 50%. El hDFI es el porcentaje de espermatozoides con el DFI mayor del 50%. Evenson establece el umbral entre el hDFI y el mDFI en el 75%. La modificación de este umbral (del 75% al 50%) es debido a las diferencias interespecíficas en la estructura de la cromatina espermática entre el hombre y el carnero. El tDFI es la suma de hDFI y mDFI. Por último, el HDS es definido como el DNA con alta tinción. Se trata de una medida del grado de condensación del DNA (Evenson et al., 2002). Los valores medios y sus desviaciones estándar están representados en la Tabla 3, y los valores de cada réplica experimental están representados gráficamente en las figuras 13 a 18.

Los parámetros xDFI y SDDFI reflejaron claramente la dinámica de las poblaciones visualizadas en los citogramas. Los tratamientos con más daño mostraron valores de xDFI más elevados, puesto que las nubes de puntos se desplazaron hacia valores de DFI mayores cuando se incrementó el daño al DNA (Figura 13). A esto suele acompañarlo un incremento de SDDFI (Figura 14), ya que el daño no es homogéneo en toda la población espermática, por lo que hay espermatozoides con más daño y otros con menos daño, resultando en un alargamiento de la población a lo largo de los valores de DFI.

En cuanto a la proporción de espermatozoides con un DFI mayor del 25%, un hecho destacable fue que muy pocos tuvieron valores mayores del 50% (hDFI). Hay que recordar que, atendiendo a resultados preliminares, decidimos rebajar el límite para considerar un espermatozoide como hDFI (de 75% en humano a 50% en ovino). Aún así, solo aparecieron espermatozoides hDFI en las muestras con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato a 1 mM en los muestreos a 6 y 24 h y con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM en el muestreo a 24 h (Figura 16).

Teniendo en cuenta estos resultados para hDFI, mDFI y tDFI tuvieron resultados prácticamente idénticos, por lo que en este trabajo nos centraremos solo en el tDFI (Figura 17). Esta variable representa la proporción de espermatozoides con un DFI mayor del 25%, por tanto, con alteraciones en la cromatina (identificadas por lo

general con fragmentación del ADN). En las muestras Control muy pocos espermatozoides cruzaron este umbral del 25% de DFI, con casi todos los espermatozoides dentro de la llamada población principal. La mayoría de los tratamientos no tuvieron un efecto apreciable en esta variable, con valores similares a los de los controles (Figura 17). Destacaron los tratamientos de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato a 1 mM, que causaron un incremento muy notable en todos los tiempos. De hecho, a las 24 h casi todos los espermatozoides sometidos a este tratamiento se encontraron dentro de la COMP, fuera de la población principal (Anexo II, citograma A26). El  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato a 0,1 mM incrementó tDFI de forma más moderada, pero evidente a las 24 h. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  elevó tDFI de forma bastante notable, pero solo a 100 mM y tras 24 h, con poco efecto en otras concentraciones y tiempos. No obstante, más del 70% de los espermatozoides fueron clasificados como tDFI en este análisis.

El HDS es una variable que depende del grado de compactación de la cromatina, informando de la proporción de espermatozoides muy teñidos por el naranja de acridina (que alcanza una mayor concentración en la cabeza espermática si la cromatina es laxa). En este trabajo establecimos un límite en el canal 600 de la fluorescencia verde, que parece más adecuado para las muestras de pequeños rumiantes (García-Macias et al., 2006). En general, nuestras muestras tuvieron entre un 10% y un 15% de HDS, con un pequeño aumento al transcurrir el tiempo de incubación y con los tratamientos  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato 0,01 mM y 0,1 mM, así como con Fenton 0,1 mM y 1 mM. El tratamiento  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato 1 mM redujo apreciablemente el valor de esta variable, ya que la intensidad de la fluorescencia verde decreció en las muestras a las que se aplicó este oxidante. En estas muestras, HDS decreció con el tiempo de incubación (Figura 18).

Es importante destacar el efecto del tratamiento  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato 1 mM. Este tratamiento resultó tan agresivo que no solo incrementó el valor de tDFI (Figura 17), sino que alteró notablemente las características del citograma, con un gran aumento de xDFI (Figura 13) (posición de la nube en cuanto a la relación rojo/fluorescencia total) y SDDFI (Figura 14) (forma de la nube, mucho más dispersa en las muestras tratadas con este oxidante). Mientras que a las 3 h en este tratamiento aún se pudo



identificar la población original y una población “gemela” con un DFI más alto y en COMP (Anexo II, citograma A5), a las 6 h y, sobre todo, a las 24 h (Anexo II, citograma A25), la población principal prácticamente desapareció y casi todas las células formaron parte de COMP, formando una población alargada en el sentido del eje de la fluorescencia roja, dando lugar a un citograma similar DFI vs. fluorescencia total y un histograma aplanado, en vez del típico pico de los histogramas del SCSA. La disminución de la fluorescencia verde provocó un valor menor de HDS, como se ha mencionado en el párrafo anterior.

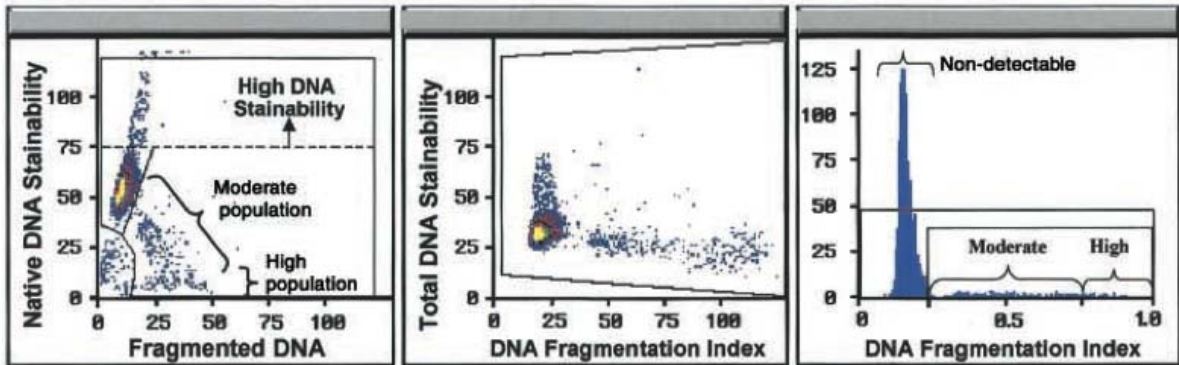
El análisis estadístico se centró en determinar el efecto del tiempo y de cada tratamiento en las variables obtenidas del SCSA, utilizando modelos lineales de efectos mixtos. Tal como sugieren los datos obtenidos, las variables del SCSA variaron muy poco con el tiempo, excepto en los casos donde hubo un daño apreciable (Figura 19). Estudiando la variación de los controles con el tiempo, encontramos un aumento significativo y muy pequeño de las alteraciones de la cromatina, que fue significativo solo a las 24 h (xDFI y tDFI) (Figura 19, xDFI y tDFI), aunque el valor de HDS se incrementó en el muestreo 3 h (Figura 19, HDS).

Después estudiamos el efecto de los tratamientos oxidantes dentro de cada muestreo. En las figuras 20 a 25 se muestra la variación de cada variable respecto al Control respectivo, según el efecto de cada oxidante y dosis. El análisis confirmó las observaciones iniciales. En el caso de xDFI (Figura 20), las concentraciones 0,1 mM y 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato tuvieron un efecto significativo, siendo la magnitud del efecto mucho mayor para 1 mM e incrementándose éste con el tiempo. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM tuvo un efecto significativo y similar al de 0,1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato. El Fenton 1 mM tuvo efecto solo a las 24 h, y este efecto fue menor al de los otros tratamientos (de hecho, pasó desapercibido en una primera evaluación de los datos). En el caso del SDDFI (Figura 21), se observó menos cambios significativos respecto a los controles, con solo 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato teniendo un efecto significativo en todos los muestreos. Este resultado fue consecuencia de la deformación de la nube de puntos en el citograma del SCSA, que no fue muy acusada con otros tratamientos, y que resultó en una mayor desviación de los valores de DFI.

En cuanto a la proporción de espermatozoides con DFI alto (>25%), solo 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato tuvo un efecto significativo sobre hDFI, como esperábamos (Figura 23). El análisis de tDFI refleja la evolución observada en las muestras, con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato ejerciendo un efecto muy significativo y creciente con el tiempo, y un efecto menor pero también significativo a 0,1 mM. Del resto de tratamientos, solo 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  tuvo un efecto significativo en tDFI, y a 24 h (Figura 24).

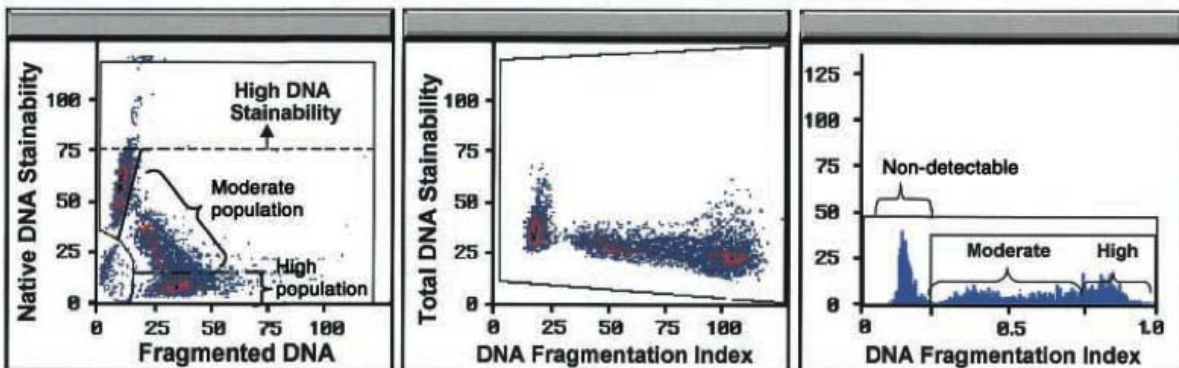
El efecto de 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato fue también muy significativo en HDS a todos los tiempos, confirmando la disminución de esta variable en las muestras sometidas a este tratamiento (Figura 25). Los tratamientos con 1 mM Fenton a 3 h y 0,1 mM Fenton a 6 h incrementaron ligera pero significativamente los valores de HDS, sugiriendo un cierto efecto de estos tratamientos sobre la estructura de la cromatina.

### Pregnancy Outcome = Pregnant



Patient	Date	Measurement	mean DFI	SD DFI	DFI	HDS
7272-87	####	1	213.5	111.6	6.8	5.0
		2	221.2	118.1	8.3	5.4
		mean	217.4	114.8	7.5	5.2
		sd	5.4	4.6	1.1	0.2

### Pregnancy Outcome = NOT Pregnant



Patient	Date	Measurement	mean DFI	SD DFI	DFI	HDS
7272-113	####	1	563.7	307.0	64.9	6.4
		2	561.4	304.8	64.9	7.2
		mean	562.6	305.9	64.9	6.8
		sd	1.2	1.1	0.0	0.4

Figura 11. Resultados del test SCSA en muestras de humano. Muestra de un paciente fértil (arriba) y de un paciente infértil (abajo) (Evenson et al., 2002). Los citogramas revelan toda la información que proporciona el método SCSA. En el citograma de la izquierda, el eje X representa el DNA fragmentado, fluorescencia roja, y el eje Y, el DNA estable, que emite fluorescencia verde. El citograma central representa en el eje X, DFI que es el ratio entre la fluorescencia roja y la total, y en el eje Y, la fluorescencia total, es decir, la suma de la fluorescencia roja y verde. Por último, el histograma de la derecha representa la fragmentación del DNA (con cada una de las subpoblaciones, moderado y alto) (Evenson et al., 2002).

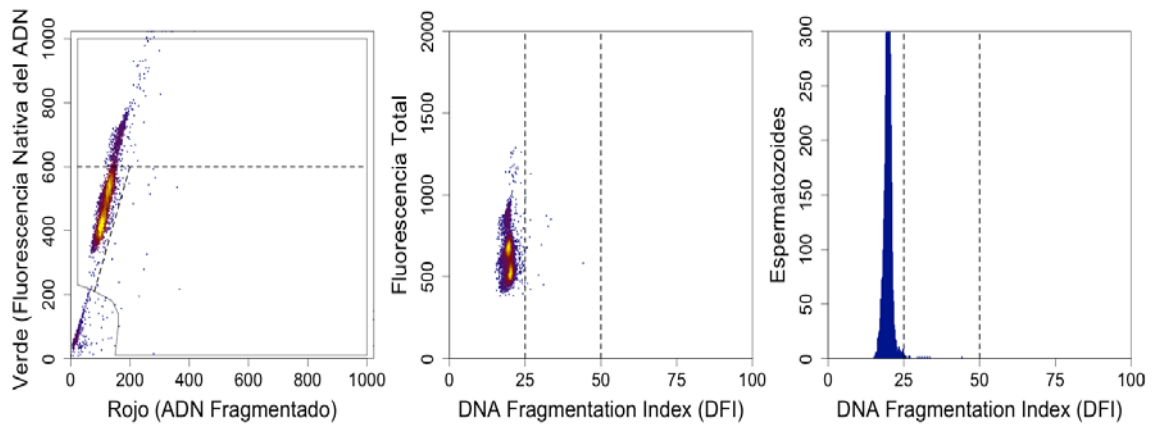
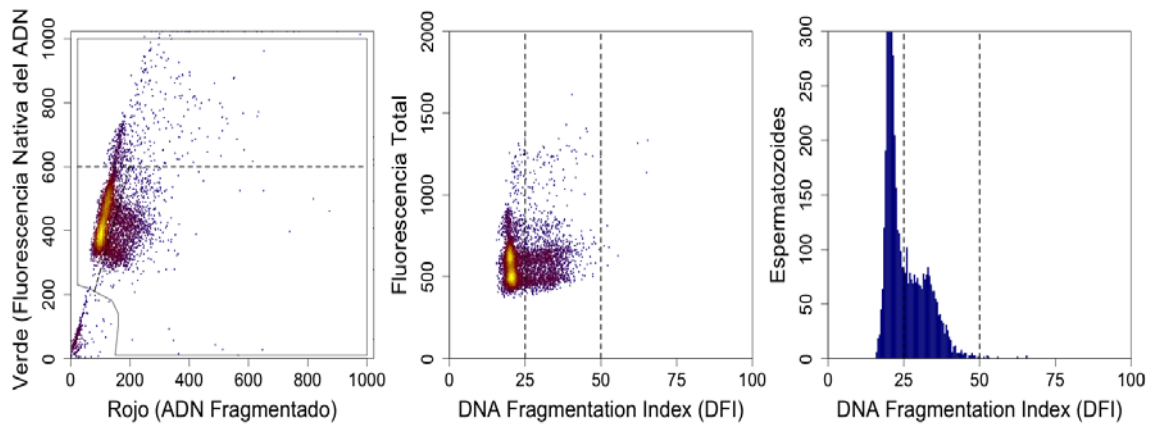


Figura 12. Citogramas del análisis de una muestra tratada con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato e incubada durante 3 h a 37 °C (superior) y los citogramas de una muestra tratada con 1 mM de peróxido de hidrógeno e incubada durante 3 h a 37 °C (inferior). El citograma de la izquierda muestra los eventos capturados según su fluorescencia roja y verde (la escala muestra canales de fluorescencia, en una escala lineal). En este citograma, los eventos cercanos al origen son descartados (ruido, restos celulares, restos de diluyente, etc.). Se puede apreciar una población principal (cromatina no alterada) a la izquierda y, a la derecha de la línea diagonal de trazos, las células fuera de la población principal (COMP), con cromatina alterada (incremento de la fluorescencia roja sobre la verde). Los eventos por encima de la línea horizontal (fluorescencia verde sobre el canal 600) forman parte del HDS (proporción de espermatozoides con alta tinción del DNA, posiblemente con cromatina laxa). El citograma central enfrenta los valores de DFI (calculados a partir de los valores verdes y rojo de cada espermatozoide) con los valores de fluorescencia central. Se aprecia claramente la nube de puntos que forman las COMP, a la derecha del límite de 25% del DFI. En este estudio hemos establecido dos límites para calcular la proporción de espermatozoides en COMP. La variable mDFI es el porcentaje de espermatozoides con DFI mayor de 25% pero menor de 50%, y hDFI es el porcentaje de espermatozoides con DFI mayor de 50%. A la derecha se muestra un histograma de DFI, distinguiéndose el pico de la población principal y las células con DFI más alto formando una prolongación a la derecha.

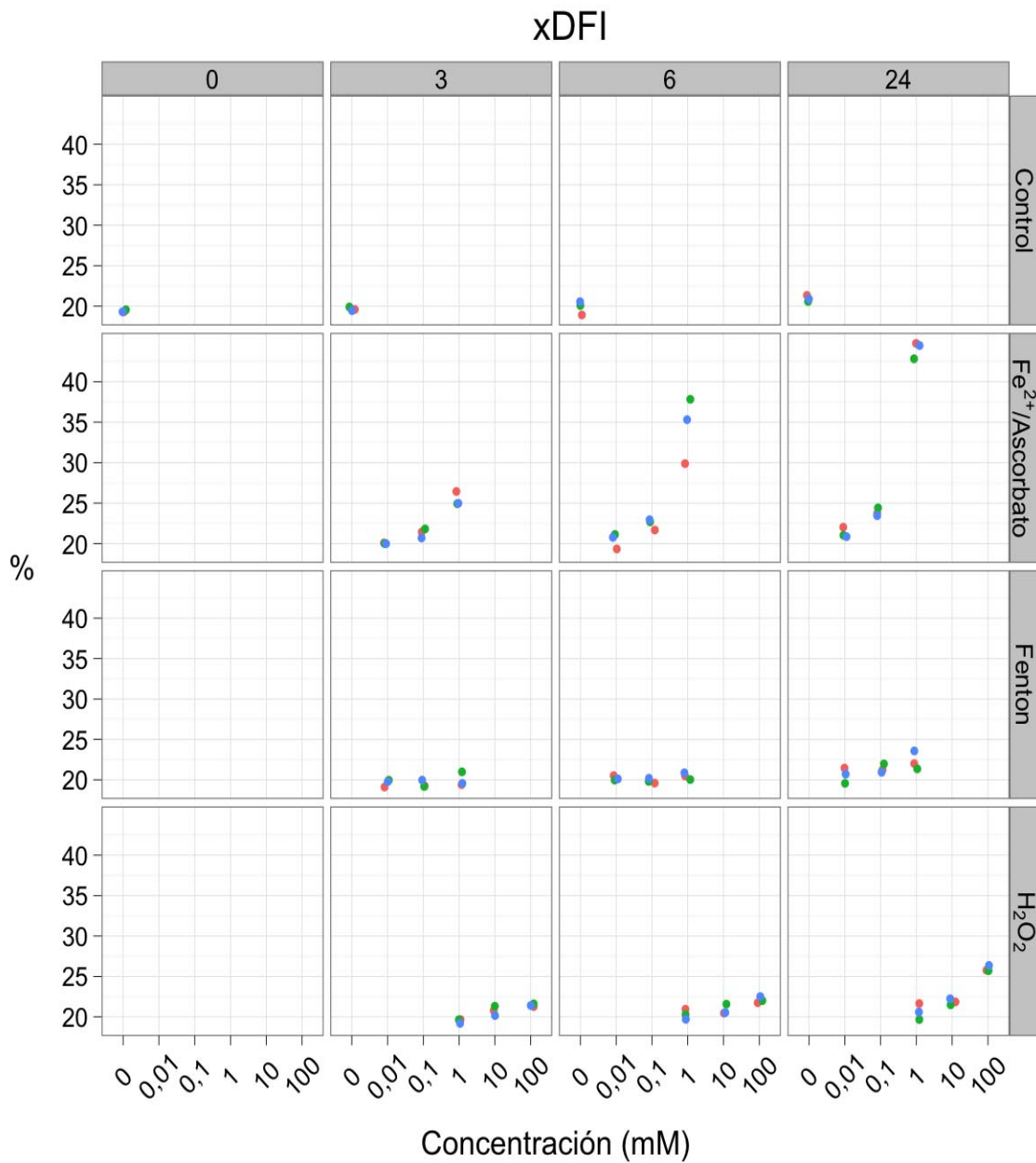


Figura 13. Representación de los valores de cada réplica para xDFI. A tiempo 0 solo se obtuvieron datos del Control. Se observó claramente el incremento de xDFI en 1 mM de Fe<sup>2+</sup>/ascorbato, y más ligeramente en 0,1 mM de Fe<sup>2+</sup>/ascorbato y en 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 24 h.

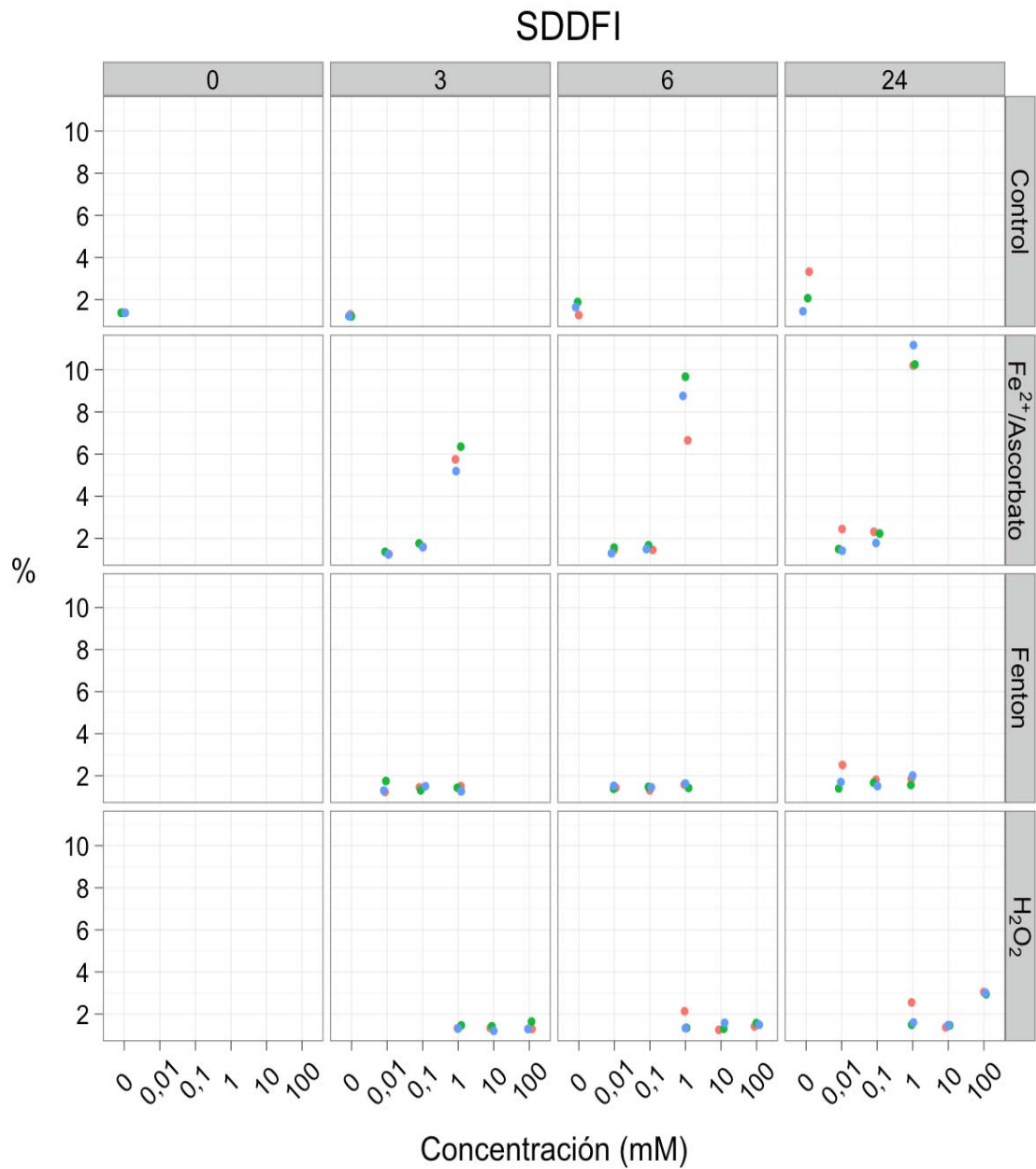


Figura 14. Representación de los valores de cada réplica para SDDFI (desviación estándar de DFI). A tiempo 0 solo se obtuvieron datos del Control. Se observó claramente el incremento de SDDFI en 1 mM de Fe<sup>2+</sup>/ascorbato, y más ligeramente en 0,1 mM de Fe<sup>2+</sup>/ascorbato y en 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 24 h.



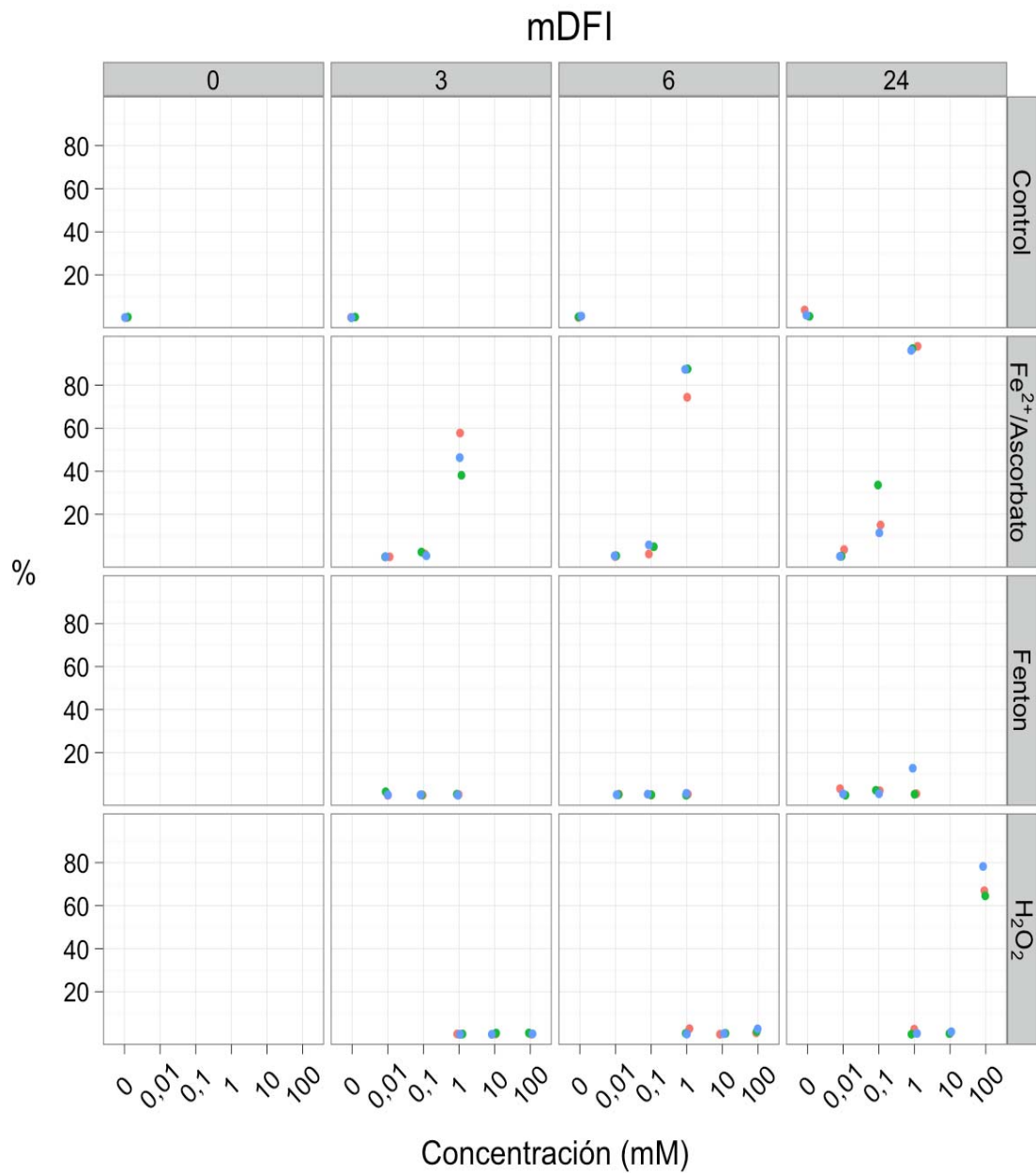


Figura 15. Representación de los valores de cada réplica para mDFI (Índice de fragmentación del DNA moderado, DFI entre el 25% y el 50%). Solo aparecieron espermatozoides mDFI en las muestras con Fe<sup>2+</sup>/ascorbato a 1 mM en los muestreos a 6 y 24 h y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM en el muestreo a 24 h.

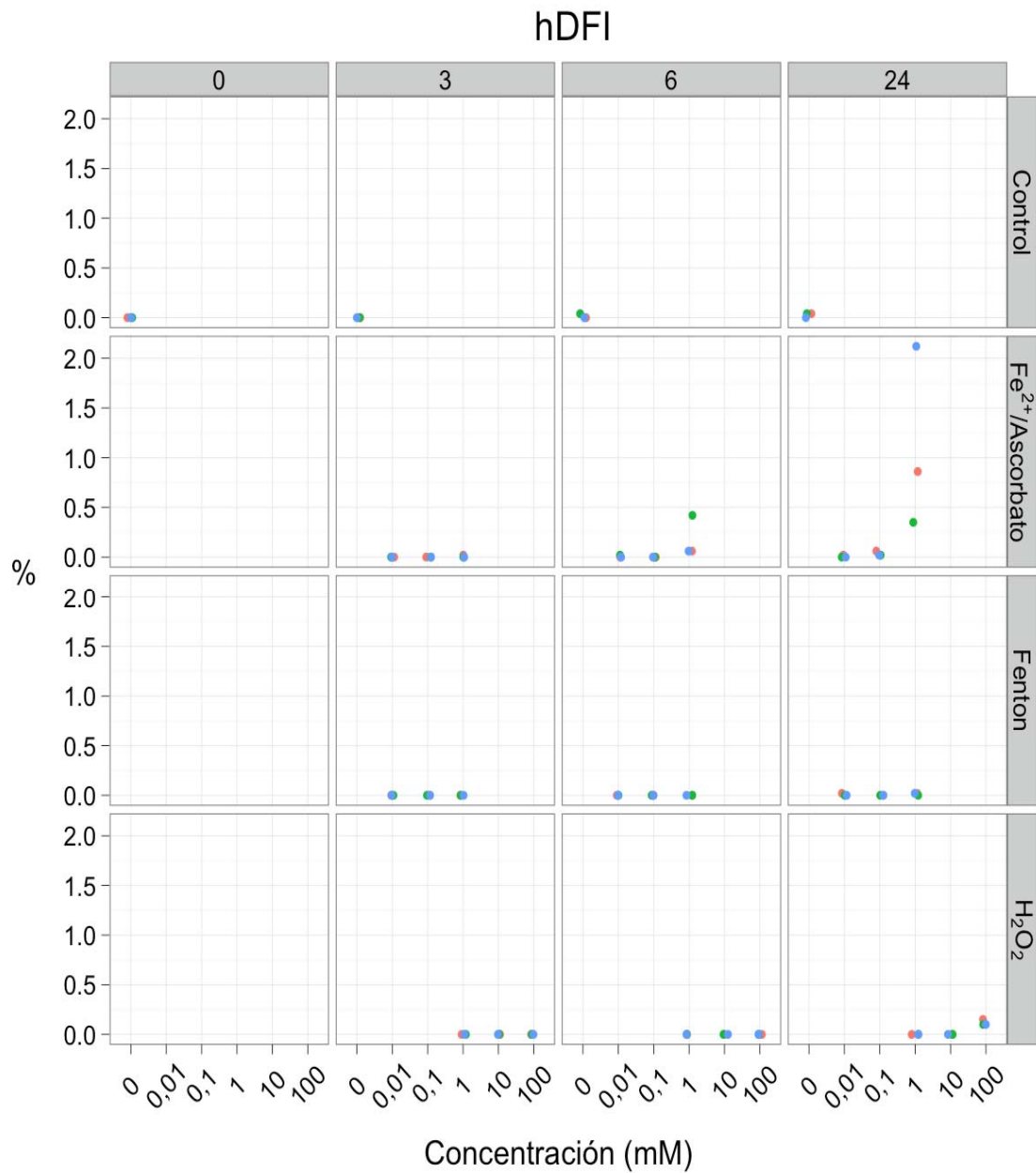


Figura 16. Representación de los valores de cada réplica para hDFI (Índice de fragmentación del DNA elevado, DFI mayor del 50%). Solo aparecieron espermatozoides hDFI en las muestras con Fe<sup>2+</sup>/ascorbato a 1 mM en los muestreos a 6 y 24 h y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM en el muestreo a 24 h.



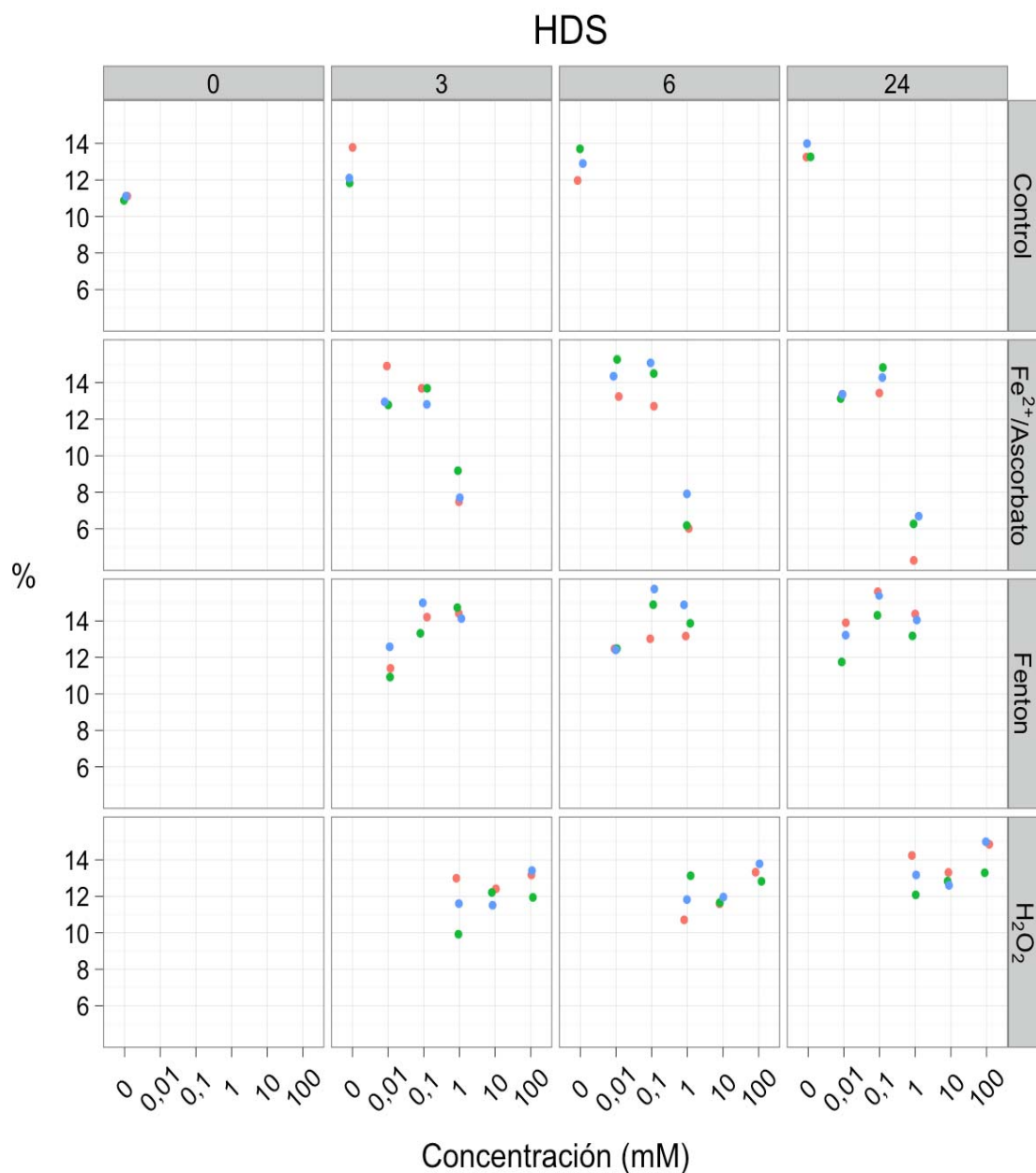


Figura 18. Representación de los valores de cada réplica para HDS (alto grado de tinción). El HDS en nuestras muestras se encuentra en un valor medio entre el 10% y el 15%. Se ve incrementado según transcurre el tiempo de incubación y con los tratamientos de Fe<sup>2+</sup>/ascorbato 0,01 y 0,1 mM, y también con Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mM y 1 mM. El tratamiento Fe<sup>2+</sup>/ascorbato 1 mM decreció el valor de HDS, debido a que la fluorescencia verde decreció en estas muestras.

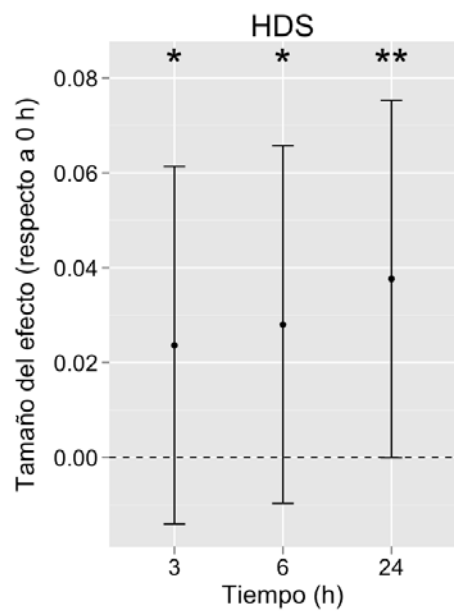
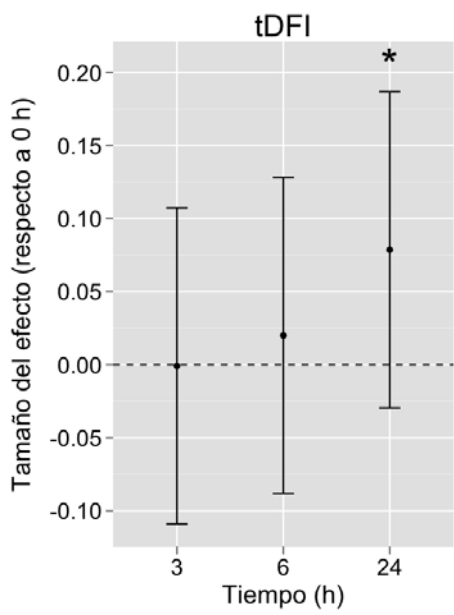
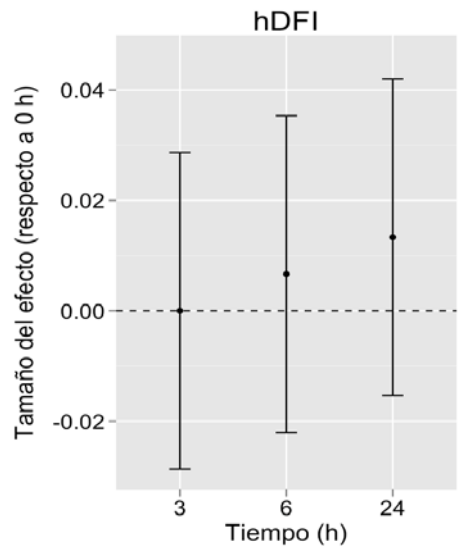
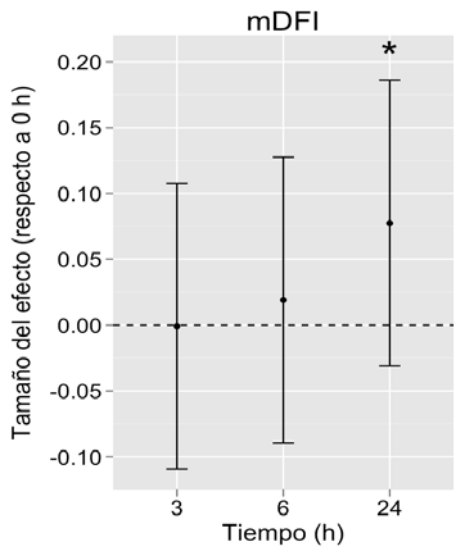
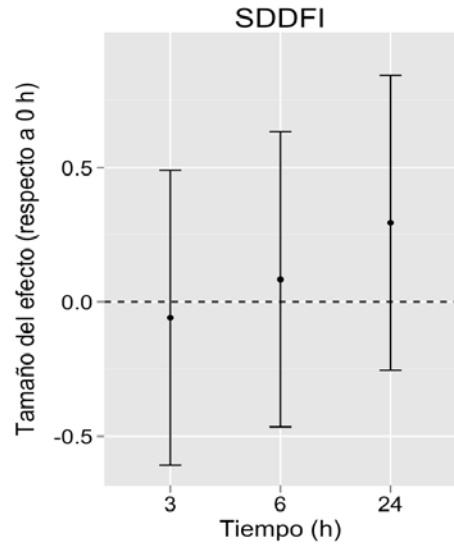
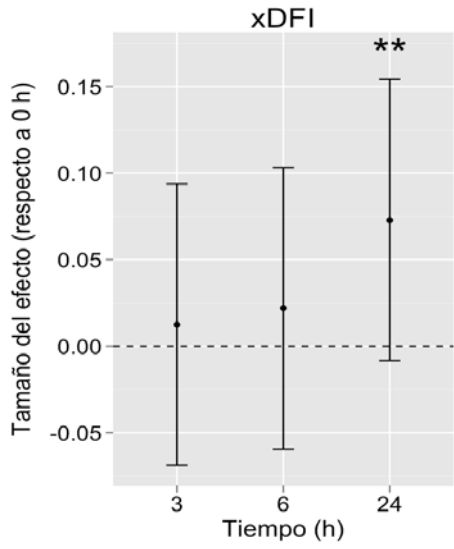


Figura 19. Análisis estadístico del efecto del tiempo en las muestras Control. Se muestran los límites del intervalo de confianza al 95% para el efecto de cada tiempo sobre el muestreo a las 0 h (el punto indica la media). Un efecto significativo (aumento o reducción del valor de la variable que probablemente no se deba al azar) se indica con \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) o \*\*\* ( $P < 0,001$ ). La línea horizontal indica el efecto 0 (sin efecto respecto al tiempo 0 h).

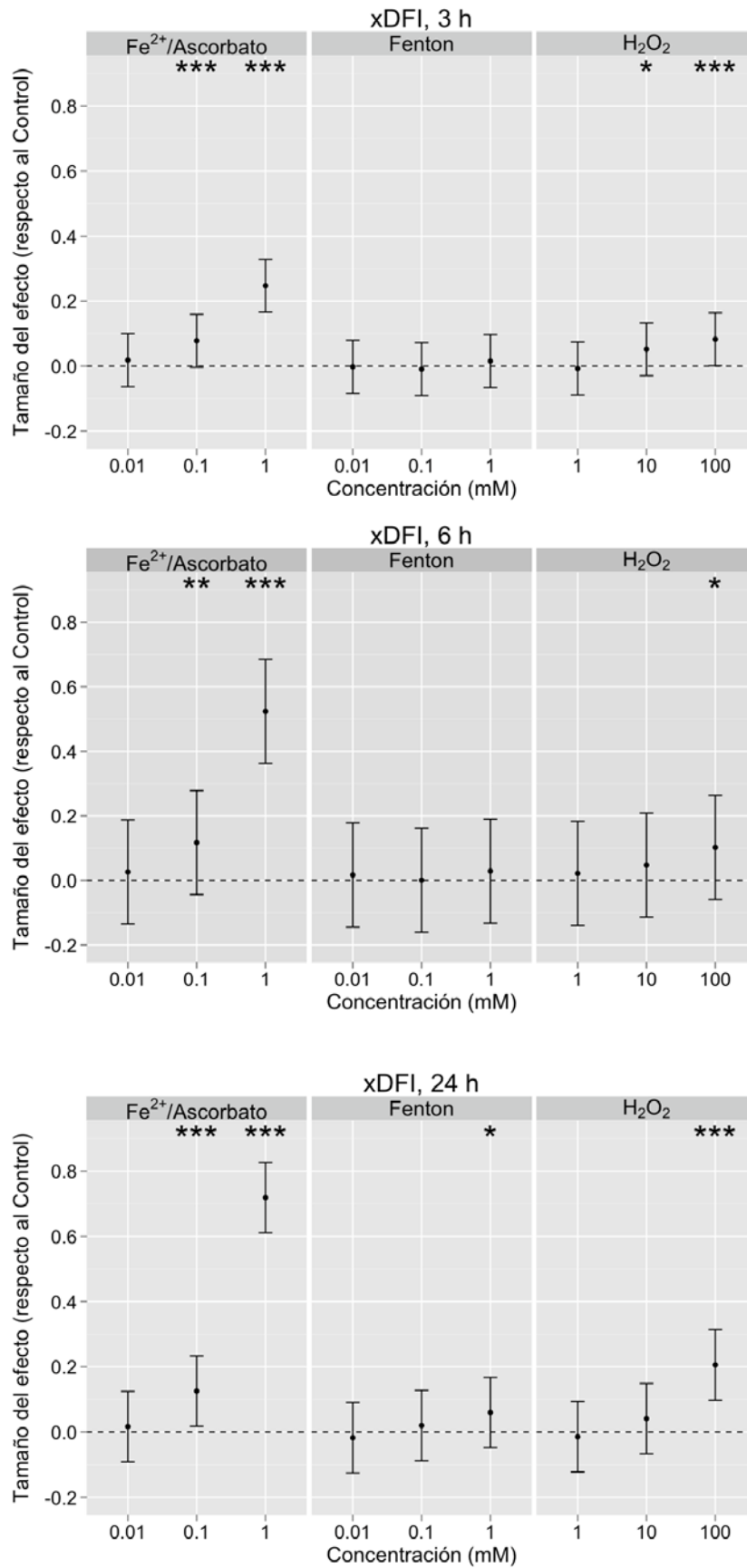


Figura 20. Análisis estadístico del efecto de los tratamientos oxidantes sobre la variable xDFI. Se muestran los límites del intervalo de confianza al 95% para el efecto de cada tiempo sobre el Control del muestreo correspondiente (el punto indica la media). Un efecto significativo (aumento o reducción del valor de la variable que probablemente no se deba al azar) se indica con \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) o \*\*\* ( $P < 0,001$ ). La línea horizontal indica el efecto 0 (sin efecto respecto al Control respectivo).



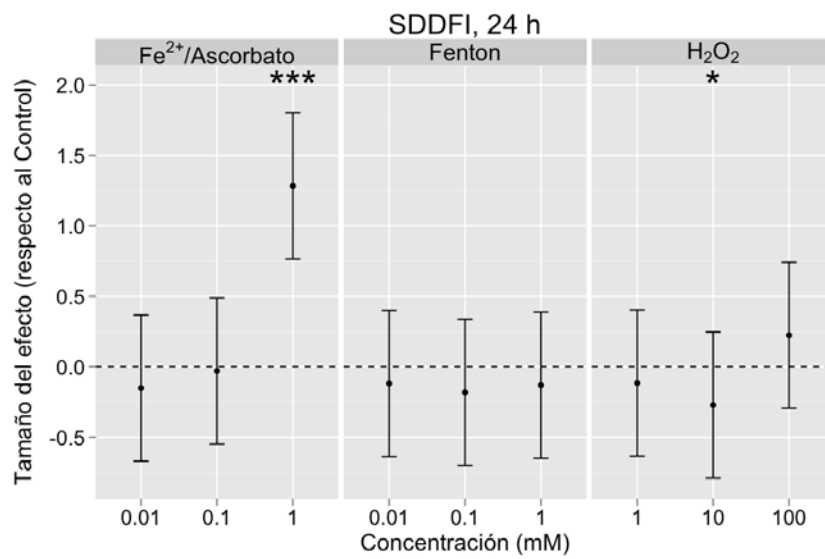
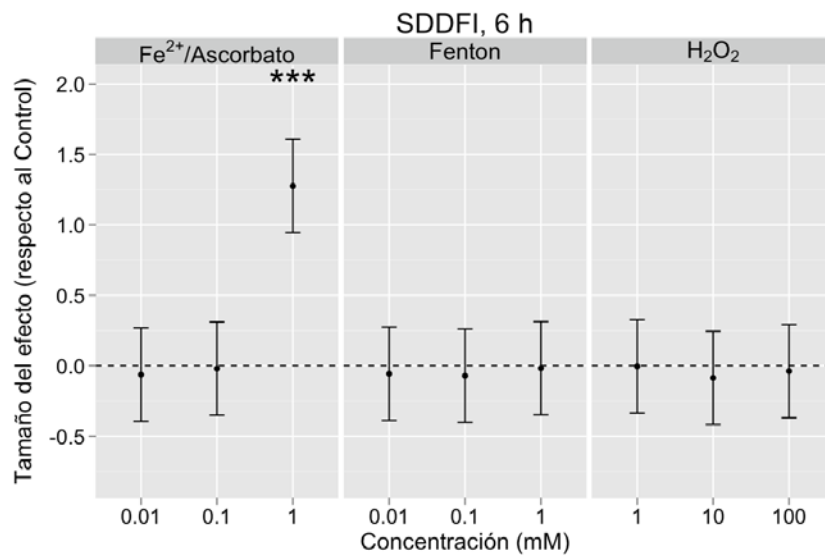
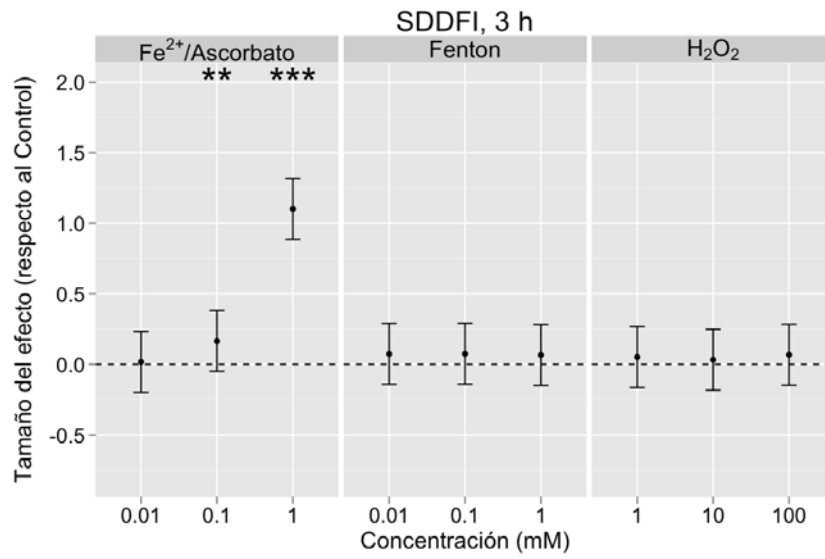


Figura 21. Análisis estadístico del efecto de los tratamientos oxidantes sobre la variable SDDFI. Se muestran los límites del intervalo de confianza al 95% para el efecto de cada tiempo sobre el Control del muestreo correspondiente (el punto indica la media). Un efecto significativo (aumento o reducción del valor de la variable que probablemente no se deba al azar) se indica con \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) o \*\*\* ( $P < 0,001$ ). La línea horizontal indica el efecto 0 (sin efecto respecto al Control respectivo).

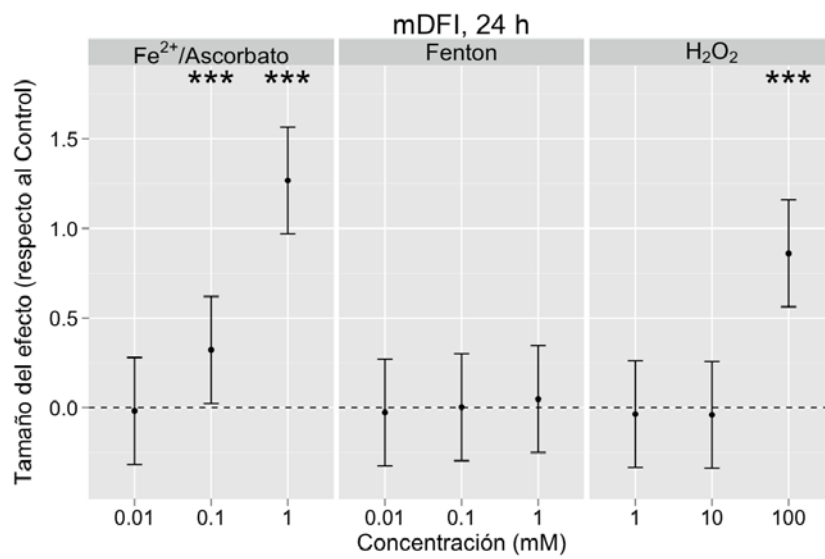
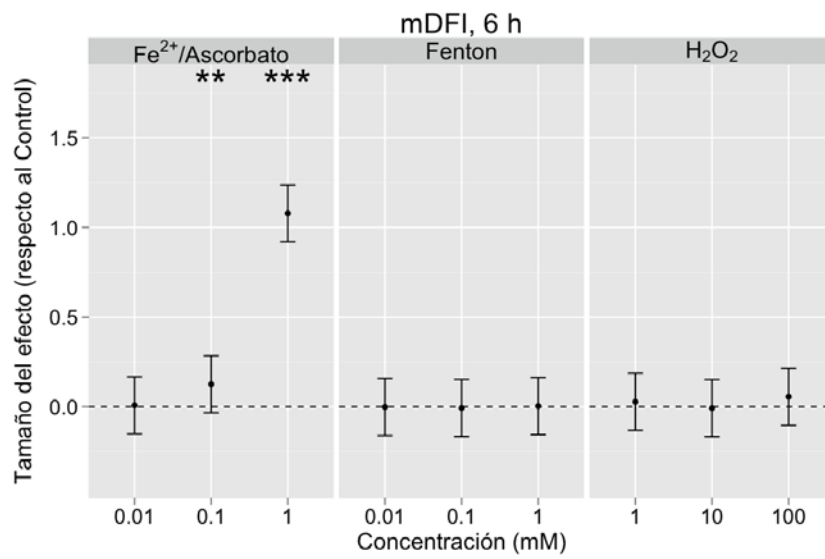
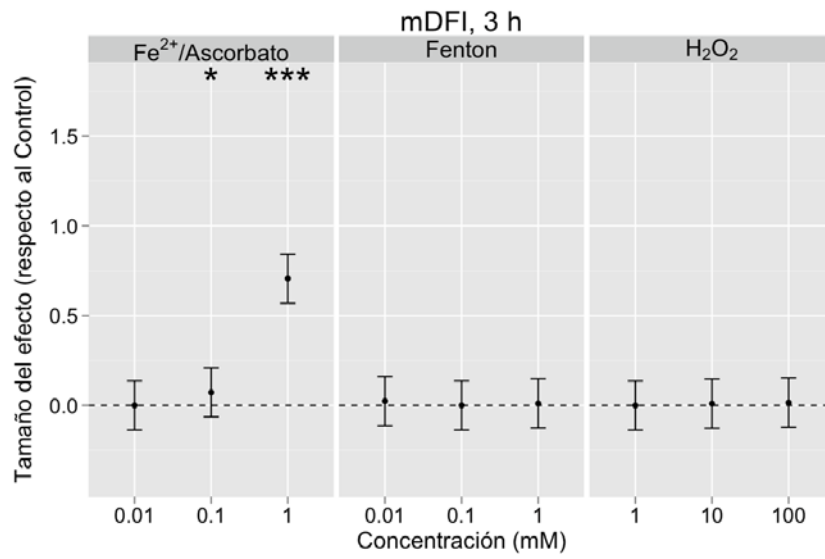


Figura 22. Análisis estadístico del efecto de los tratamientos oxidantes sobre la variable mDFI. Se muestran los límites del intervalo de confianza al 95% para el efecto de cada tiempo sobre el Control del muestreo correspondiente (el punto indica la media). Un efecto significativo (aumento o reducción del valor de la variable que probablemente no se deba al azar) se indica con \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) o \*\*\* ( $P < 0,001$ ). La línea horizontal indica el efecto 0 (sin efecto respecto al Control respectivo).

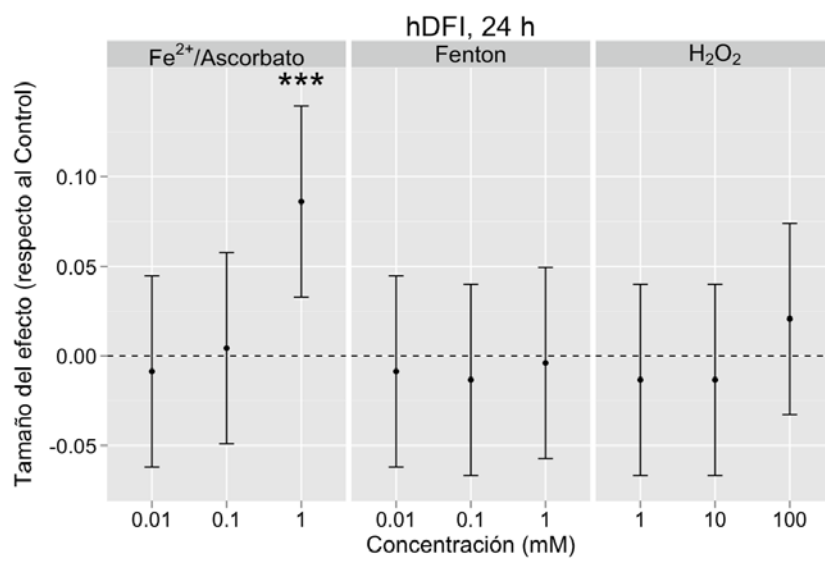
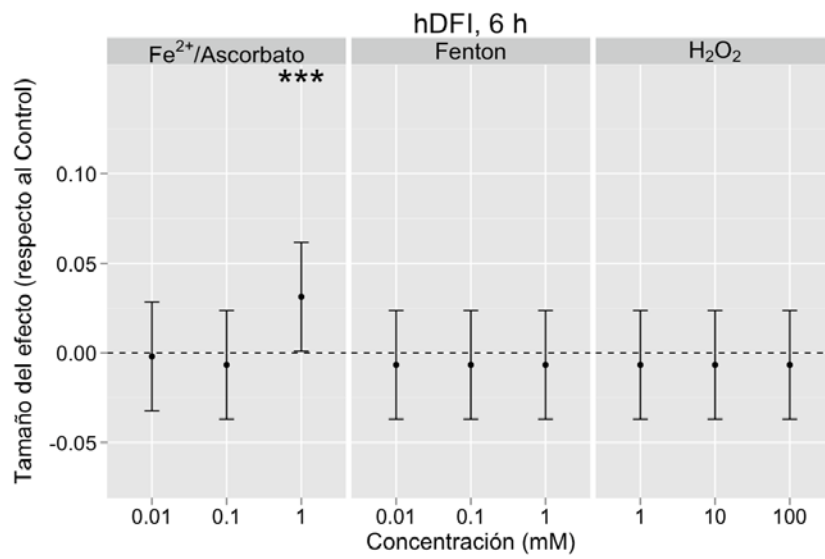
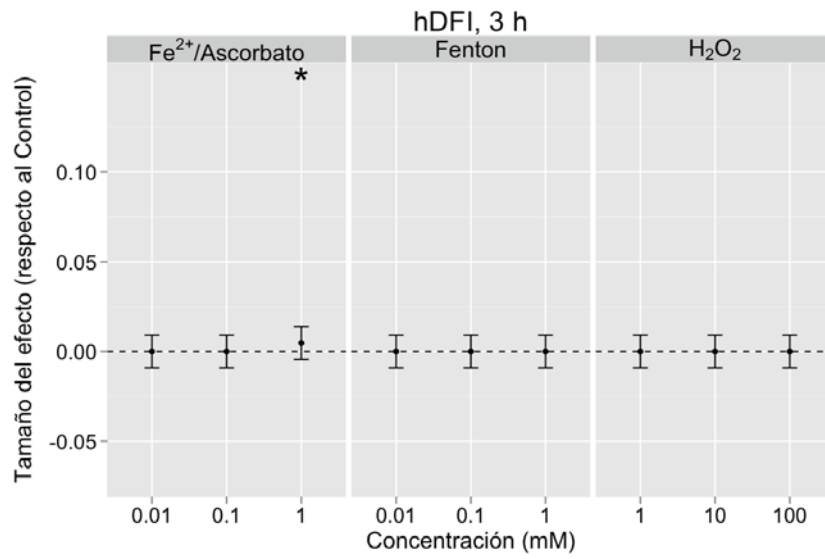


Figura 23. Análisis estadístico del efecto de los tratamientos oxidantes sobre la variable hDFI. Se muestran los límites del intervalo de confianza al 95% para el efecto de cada tiempo sobre el Control del muestreo correspondiente (el punto indica la media). Un efecto significativo (aumento o reducción del valor de la variable que probablemente no se deba al azar) se indica con \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) o \*\*\* ( $P < 0,001$ ). La línea horizontal indica el efecto 0 (sin efecto respecto al Control respectivo).

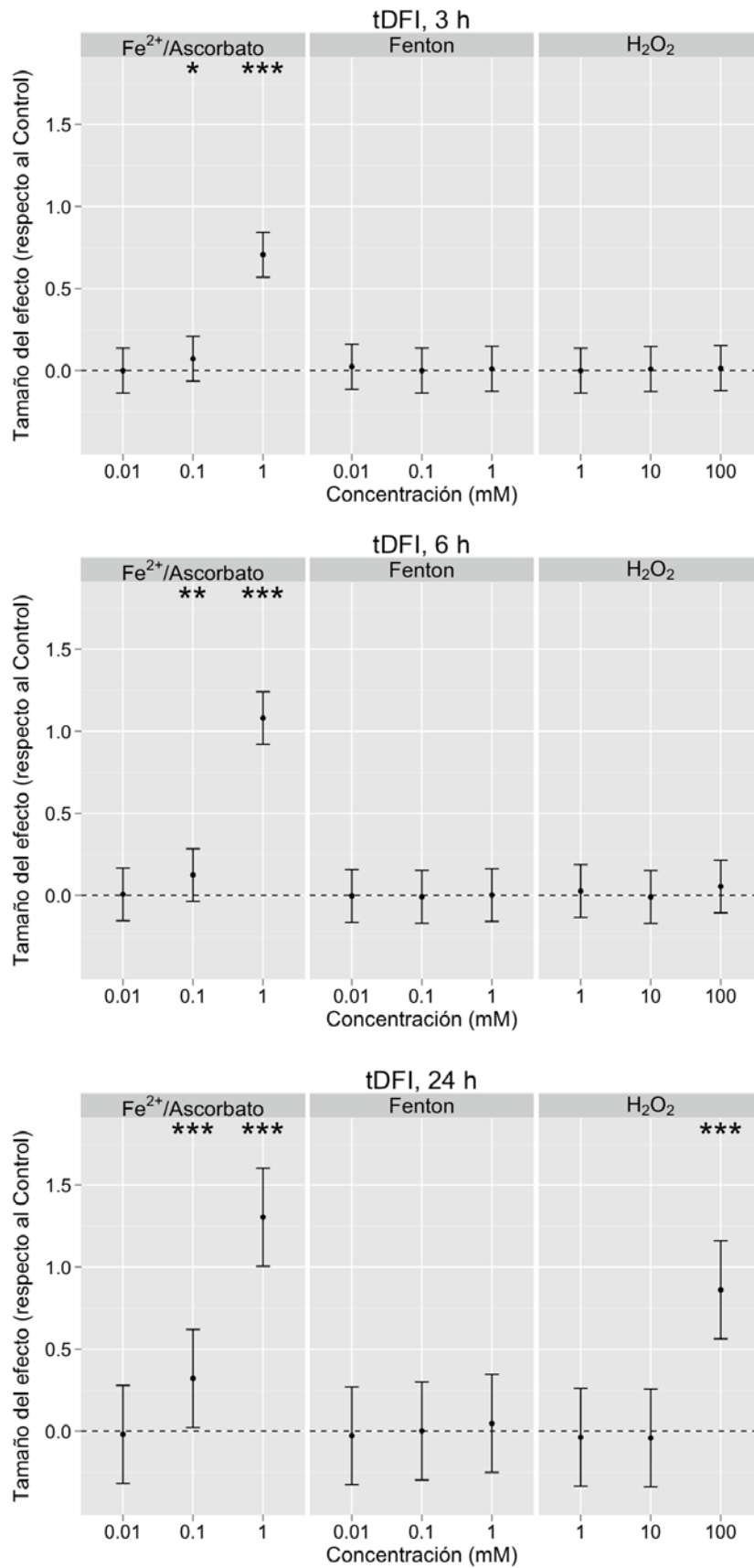


Figura 24. Análisis estadístico del efecto de los tratamientos oxidantes sobre la variable tDFI. Se muestran los límites del intervalo de confianza al 95% para el efecto de cada tiempo sobre el Control del muestreo correspondiente (el punto indica la media). Un efecto significativo (aumento o reducción del valor de la variable que probablemente no se deba al azar) se indica con \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) o \*\*\* ( $P < 0,001$ ). La línea horizontal indica el efecto 0 (sin efecto respecto al Control respectivo).



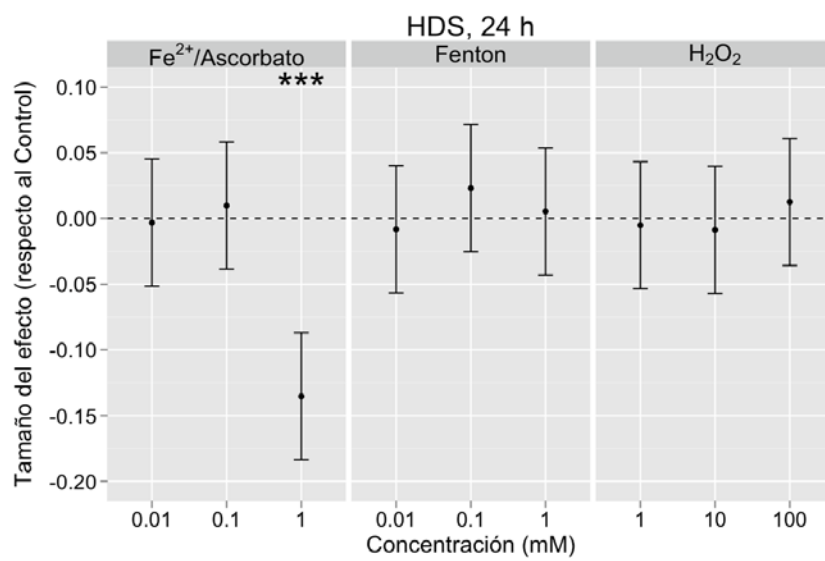
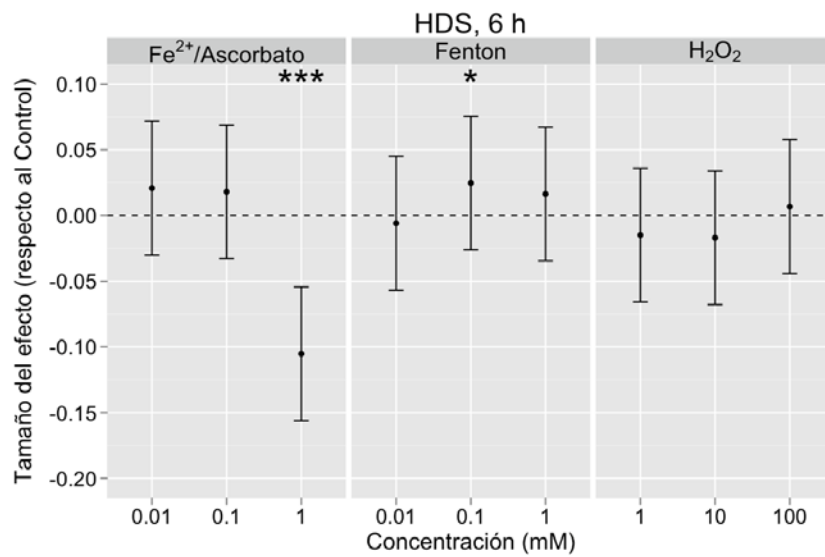
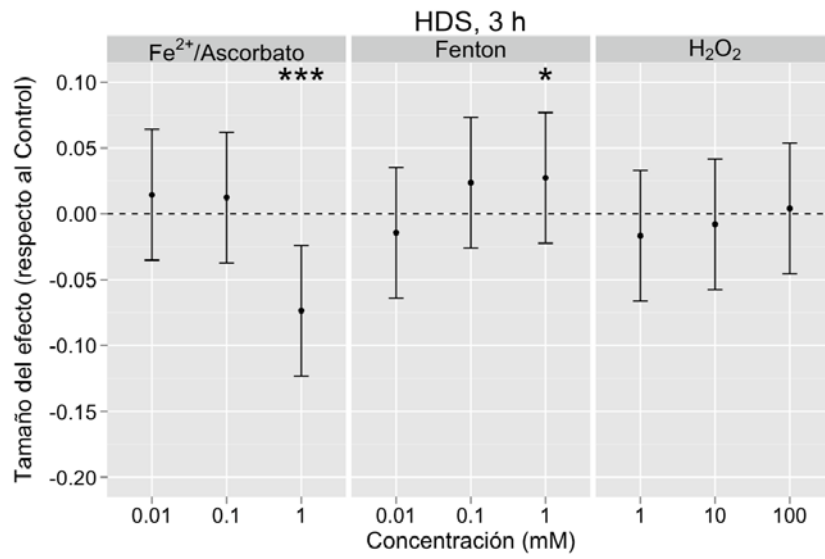


Figura 25. Análisis estadístico del efecto de los tratamientos oxidantes sobre la variable HDS. Se muestran los límites del intervalo de confianza al 95% para el efecto de cada tiempo sobre el Control del muestreo correspondiente (el punto indica la media). Un efecto significativo (aumento o reducción del valor de la variable que probablemente no se deba al azar) se indica con \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) o \*\*\* ( $P < 0,001$ ). La línea horizontal indica el efecto 0 (sin efecto respecto al Control respectivo).

Tabla 3. Resultados SCSA de los tratamientos control, Fe<sup>2+</sup>/ascorbato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Medias±desviaciones estándar). Continúa en la página siguiente.

Incubación (h)	Tratamiento	mM	xDFI	SDDFI	mDFI (%)	hDFI (%)	tDFI (%)	HDS (%)
0	Control	0	19.4±0.1	1.4±0	0.3±0.1	0±0	0.3±0.1	11±0.1
3	Control	0	19,6±0,2	1,2±0	0,3±0,1	0±0	0,3±0,1	12,6±1,1
3	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	0,01	20±0,1	1,3±0,1	0,3±0	0±0	0,3±0	13,5±1,2
3	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	0,1	21,3±0,6	1,6±0,1	1,7±0,9	0±0	1,7±0,9	13,4±0,5
3	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	1	25,4±0,9	5,8±0,6	47,4±9,8	0±0	47,4±9,9	8,1±0,9
3	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,01	19,6±0,4	1,4±0,3	0,8±0,9	0±0	0,8±0,9	11,6±0,9
3	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1	19,5±0,4	1,4±0,1	0,3±0,1	0±0	0,3±0,1	14,2±0,8
3	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	20±0,9	1,4±0,1	0,4±0,3	0±0	0,4±0,3	14,4±0,3
3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	19,5±0,3	1,4±0,1	0,3±0,1	0±0	0,3±0,1	11,5±1,5
3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	20,8±0,6	1,3±0,1	0,4±0,3	0±0	0,4±0,3	12±0,5
3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100	21,4±0,2	1,4±0,2	0,5±0,3	0±0	0,5±0,3	12,8±0,8
6	Control	0	19,9±0,8	1,6±0,3	0,6±0,3	0±0	0,6±0,3	12,9±0,9
6	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	0,01	20,4±0,9	1,4±0,1	0,7±0,2	0±0	0,7±0,2	14,3±1
6	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	0,1	22,4±0,7	1,5±0,1	4,1±2,2	0±0	4,1±2,2	14,1±1,2
6	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	1	34,3±4,1	8,4±1,5	83±7,5	0,2±0,2	83,2±7,6	6,7±1

xDFI, media de DFI (roja/fluorescencia roja+verde); SDDFI, desviación estándar de DFI; mDFI, índice de fragmentación del DNA moderado; hDFI, índice de fragmentación del DNA alto; tDFI, índice de fragmentación del DFI total (hDFI+mDFI); HDS, alto de grado de tinción.

Tabla 3 (cont.). Resultados SCSA de los tratamientos control, Fe<sup>2+</sup>/ascorbato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Medias±desviaciones estándar).

Incubación (h)	Tratamiento	mM	xDFI	SDDFI	mDFI (%)	hDFI (%)	tDFI (%)	HDS (%)
6	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,01	20,2±0,3	1,4±0,1	0,5±0,1	0±0	0,5±0,1	12,5±0
6	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1	19,9±0,3	1,4±0,1	0,4±0,2	0±0	0,4±0,2	14,6±1,4
6	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	20,5±0,4	1,5±0,1	0,6±0,4	0±0	0,6±0,4	14±0,9
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	20,3±0,6	1,6±0,5	1,2±1,4	0±0	1,2±1,4	11,9±1,2
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	20,9±0,6	1,4±0,2	0,4±0,2	0±0	0,4±0,2	11,7±0,2
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100	22,1±0,4	1,5±0,1	1,7±0,9	0±0	1,7±0,9	13,3±0,5
24	Control	0	20,9±0,4	2,3±1	1,9±1,6	0±0	1,9±1,6	13,5±0,4
24	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	0,01	21,3±0,6	1,8±0,6	1,6±1,8	0±0	1,6±1,8	13,3±0,1
24	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	0,1	23,9±0,5	2,1±0,3	20±11,9	0±0	20,1±11,9	14,2±0,7
24	Fe <sup>2+</sup> /ascorbato	1	44±1	10,5±0,5	97±0,9	1,1±0,9	98,1±0,8	5,7±1,3
24	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,01	20,6±1	1,9±0,6	1,4±1,6	0±0	1,4±1,6	13±1,1
24	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1	21,4±0,5	1,7±0,2	1,9±0,9	0±0	1,9±0,9	15,1±0,7
24	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	22,3±1,1	1,8±0,2	4,8±6,9	0±0	4,8±6,9	13,9±0,6
24	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	20,6±1	1,9±0,6	1,1±1,3	0±0	1,1±1,3	13,2±1,1
24	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	21,9±0,4	1,4±0,1	0,9±0,5	0±0	0,9±0,5	12,9±0,4

xDFI, media de DFI (roja/fluorescencia roja+ verde); SDDFI, desviación estándar de DFI; mDFI, índice de fragmentación del DNA moderado; hDFI, índice de fragmentación del DNA alto; tDFI, índice de fragmentación del DFI total (hDFI+ mDFI); HDS, alto de grado de tinción.

## 7. Discusión.

En este estudio hemos comparado los efectos de tres generadores de radicales libres de oxígeno (ROS)  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  a diferentes concentraciones y tiempos en semen de carnero. El daño producido en la cromatina espermática lo hemos evaluado mediante el método SCSA.

Es bien conocido que el núcleo de los espermatozoides de los mamíferos es una estructura muy estable, con un alto grado de organización y condensación del DNA (Ward and Coffey, 1991). La estabilidad de la cromatina es debida a puentes disulfuro covalentes entre las protaminas y el reemplazo de las histonas durante la espermatogénesis (Poccia, 1986). En este estudio, usando la técnica SCSA, se ha evaluado la susceptibilidad de la cromatina espermática de carnero a la desnaturalización (debida a la fragmentación del DNA) debido a la incubación con diferentes agentes oxidantes. El SCSA ha sido utilizado previamente para analizar el DNA espermático de toros (Ballachey et al., 1987), cerdos (Evenson et al., 1994), équidos (Lo et al., 2002), ratones (Evenson et al., 1993), ciervos, osos (García-Macías et al., 2006) y humanos (Evenson, 1999).

Los ROS tienen un doble efecto en el espermatozoide. Por una parte a bajas concentraciones participan en la transducción de señales que inducen la hiperactivación (de Lamirande and Gagnon, 1992), la capacitación (Ford, 2004), la fusión del ovocito con el espermatozoide y la reacción acrosómica (Aitken et al., 1989). Pero si las concentraciones son elevadas inducen daño en la cromatina del espermatozoide, que puede impedir que el espermatozoide fertilice el ovocito, disminuir la tasa de fertilización, aumentar la tasa de abortos y las malformaciones fetales (Virro et al., 2004). También se ha visto que elevadas concentraciones de ROS están correlacionadas con una pobre motilidad espermática y con otras alteraciones, como la peroxidación lipídica (Peris et al., 2007).

No obstante, el origen del daño en el DNA del espermatozoide no solamente está causado por los ROS. Hay autores que defienden que las rupturas de la hebra de cromatina es una forma de apoptosis del espermatozoide (Gorczyca et al., 1993). Se ha

descubierto que las endonucleasas presentes en el semen pueden cortar el DNA de los espermatozoides y dañar la integridad del genoma espermático (Evenson, 1999).

Existen diferencias interespecíficas entre los citogramas obtenidos mediante SCSA (García-Macias et al., 2006). En los histogramas FL-1 (fluorescencia verde) varían el número de picos, correspondientes a la población principal (Figura 27). Se ha observado la presencia de dos picos en los histogramas de rumiantes (tanto de semen eyaculado como en semen epididimario). En cambio, los histogramas de perro u oso solo presentan un pico. La presencia de dos picos en los rumiantes es debido a la morfología de la cabeza de los espermatozoides. La cabeza presenta una forma plana. Dando lugar a histogramas con picos asimétricos, que se extienden hacia mayores valores de fluorescencia. Esto es un artefacto por a la geometría y el alto índice de refracción de la cabeza del espermatozoide. Cuando el láser incide por la cara plana emite mas fluorescencia, en comparación a si lo atraviesa perpendicularmente a la cara plana (Gledhill et al., 1976). Por este motivo, en especies como el perro y el oso solamente se observa un pico, porque las cabezas de los espermatozoides son más pequeñas y cortas que las cabezas de los espermatozoides del carnero o del ciervo. Se considera que este hecho no afecta a los resultados de la fluorescencia por la proximidad de los dos picos en los rumiantes (García-Macias et al., 2006).

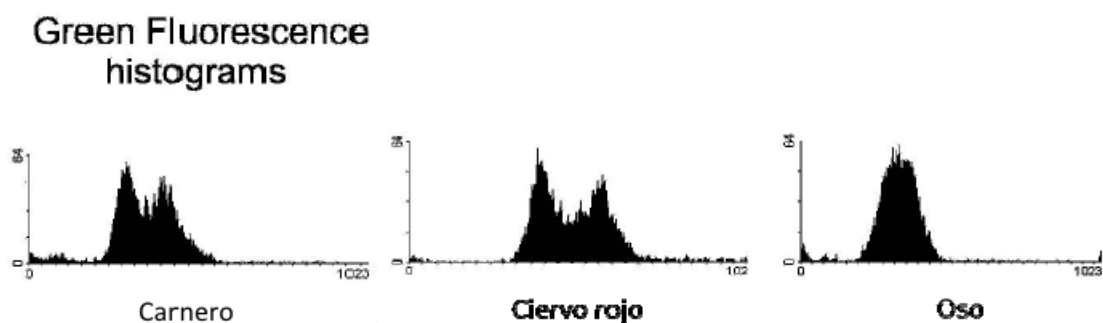


Figura 27. Histogramas FL-1 (fluorescencia verde) de SCSA realizado con espermatozoides de carnero, ciervo rojo y oso. Se observa la presencia de dos picos en los histogramas de carnero y ciervo rojo. Por el contrario, el histograma del oso solamente presenta un pico (García-Macias et al., 2006).

Otra diferencia entre especies consiste en, la compactación de la población principal. En el caso de los humanos la compactación de la población principal es menor que en el resto de las especies de mamíferos (García-Macias et al., 2006).

También se han estudiado las posibles variaciones de las características de la cromatina espermática a lo largo de los periodos reproductivos anuales. En el caso de carnero no se encontraron diferencias significativas a lo largo del año en los parámetros SCSA, pero todos los parámetros difirieron ( $P < 0.01$ ) entre el verano y la estación reproductiva y no reproductiva, indicando un alto grado de descondensación y una baja proporción de espermatozoides con alto grado de tinción (HDS). En cambio, en el oso sí que se hallaron diferencias en los diferentes periodos del año. En la época reproductiva (mayo y junio) y en los meses posteriores (julio y agosto), se ha observado que la cromatina espermática presenta mayor grado de inmadurez y descondensación que en otros periodos del ciclo reproductivo. Esto puede ser debido al que el tránsito epididimario en la temporada reproductiva es más rápido (García-Macias et al., 2006).

El efecto de los ROS también varía entre machos de la misma especie (Domínguez-Rebolledo et al., 2009).

En estudios anteriores, se ha observado que incubando semen de ciervo rojo con  $100 \mu\text{M}$  y  $1 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 180 min se produce un descenso de la motilidad de las muestras (Martínez-Pastor et al., 2009a). El descenso de la motilidad tras la incubación con peróxido de hidrógeno se ha observado también en el semen humano (Aitken et al., 1993). En el semen de carnero se han realizado estudios similares y se ha concluido que el parámetro más sensible al  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la motilidad (Peris et al., 2007). La motilidad de los espermatozoides disminuye en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo cual se atribuye a la inactivación de las enzimas glicolíticas que provienen de energía al flagelo (Baumber et al., 2000). Además, también se ha comprobado en cerdos que la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  incrementa la peroxidación lipídica e induce la capacitación (Awda et al., 2009).

En cuanto al daño que causa el peróxido de hidrógeno en la cromatina espermática. Se ha observado que el %DFI se incrementa tras la incubación con este

agente (150 y 300  $\mu\text{M}$  durante 24 h) en semen de carnero (Peris et al., 2007). En nuestro estudio, con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) solo se ha encontrado daño en el DNA a elevadas concentraciones, 100 mM y tras 24 h de incubación. El valor de tDFI fue solamente del 10%. Sin embargo, en anteriores estudios se había detectado daño con concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de tan solo 200  $\mu\text{M}$ . Esto puede ser debido a la diferente sensibilidad al peróxido de hidrógeno entre los distintos machos (Domínguez-Rebolledo et al., 2011). Las diferentes respuestas que muestran los espermatozoides de machos de la misma especie a un mismo tratamiento oxidante pueden ser debido a factores individuales, según se ha estudiado en el semen de ciervo rojo. La alimentación o condición corporal influyen sobre la resistencia o sensibilidad de los espermatozoides al estrés oxidativo. Ya que, por ejemplo, se producen cambios en la composición de las membranas o en la expresión de enzimas antioxidantes (Domínguez-Rebolledo et al., 2009).

Peris et al. (2007) informaron que el DNA de los espermatozoides de carnero es relativamente resistente al daño inducido por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta resistencia puede ser debida a que los espermatozoides de carnero solo presentan la protamina P1, a diferencia de los humanos, ratón y caballo que presentan la P1 y P2. Se ha comprobado que la cromatina espermática de especies que presentan ambas protaminas es más susceptible a la descondensación (Perreault et al., 1988). Por ello, el semen de carnero sería más resistente al estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En cerdos, se ha observado que la presencia de 0,015%  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 37 °C durante 48 h induce la fragmentación del DNA (analizado mediante SCD) (de la Torre et al., 2007). El tiempo de incubación es mucho mayor que en nuestro experimento, pero viene a confirmar que la presencia de peróxido de hidrógeno durante largos periodos de incubación induce la fragmentación del DNA espermático.

También se han realizado estudios analizando el daño que induce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el semen de ciervo rojo. Se ha comprobado que en esta especie, la exposición del semen a  $\text{H}_2\text{O}_2$  es más citotóxica que la exposición a  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato (Martínez-Pastor et al., 2009a). No obstante, el  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato parece inducir un daño mayor al ADN, tal como hemos confirmado en el presente trabajo. El DNA del semen de ciervo se fragmentó



con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero no con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Domínguez-Rebolledo et al., 2011). Fueron concentraciones de peróxido de hidrógeno menores que en nuestro estudio las que provocaron la fragmentación. Lo que apoya la teoría de la resistencia del semen de carnero a la fragmentación inducida por el peróxido de hidrógeno.

En el caso de espermatozoides humanos, no se detectaron daños en el DNA, tras incubar durante 1 h semen de hombres normospérmicos con 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En cambio, se observó daño (mediante TUNEL) tras 24 h de incubación. Estos autores indicaron que pequeñas concentraciones de ROS pueden inducir daño tras largas incubaciones (Ramos and Wetzels, 2001). En otro estudio, utilizando la técnica COMET, mostró que con tan solo 100 y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 1 h en semen de hombres normospérmicos causaba un importante incremento en el daño del DNA, y que solamente fue necesario 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para causar un pequeño incremento en el daño del DNA de muestras astenozoospérmicas (Hughes et al., 1996). En el caso del semen de humano, la mala calidad de las muestras separa a los humanos del resto de especies de mamíferos. Se ha observado en muestras procedentes de hombres fértiles que presentan un gran número de formas anormales (hasta un 85%) según la Organización Mundial de la Salud (1999). Estos bajos índices de calidad se traducen en una baja fertilidad y mayores tasas de aneuploidias, pérdidas de embarazo y defectos en los recién nacidos. Una de las causas últimas de esta alteración de los espermatozoides se ha atribuido a la formación de ROS por los propios espermatozoides y/o la interrupción de los mecanismos de defensa antioxidante en el tracto reproductivo masculino. Una de las anomalías más frecuente es la presencia de gota citoplasmática. El exceso de citoplasma conlleva un mayor número de enzimas que estimulan la producción de ROS por el propio espermatozoide (Aitken and Sawyer, 2003.)

El reactivo de Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) indujo daño al DNA del espermatozoide solo a la concentración más elevada (1 mM) tras 24 h de incubación. Este efecto fue menor al de los otros tratamientos, e incluso pasó desapercibido en la primera evaluación de los citogramas. La acción de este compuesto es debido a que el metal, en este caso el  $\text{Fe}^{2+}$ ,

cataliza una reacción que da lugar a radicales hidroxilo. Los radicales hidroxilo son unas especies reactivas muy potentes, iniciadoras de la peroxidación lipídica (Baumber et al., 2003). No obstante, debemos tener en cuenta que, en comparación con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el reactivo de Fenton fue más agresivo con las muestras. Si bien el efecto a 24 h fue incluso menor en las concentraciones más altas, utilizamos una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 veces menor en el reactivo de Fenton. Es posible que, de haber utilizado una concentración 100 mM, el efecto habría sido mucho mayor que el del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El último tratamiento fue con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato. El  $\text{Fe}^{2+}$  se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$ . El  $\text{Fe}^{3+}$  es reciclado por el ascorbato a  $\text{Fe}^{2+}$ , reacción en la cual se producen radicales hidroxilo. En estudios anteriores con semen de ciervo rojo se ha observado que este agente tiene muy poco efecto sobre la movilidad de los espermatozoides o el potencial de membrana mitocondrial, al contrario que el peróxido de hidrógeno (Martínez-Pastor et al., 2009a). Este pequeño efecto puede ser debido a que el radical hidroxilo tiene una vida muy corta y, es relativamente impermeable en las membranas biológicas (Martínez-Pastor et al., 2009a). Por el contrario, otro estudio con ciervo rojo demuestra que tras incubación con  $100 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  y  $1 \text{ mM}$  ascorbato durante 6 h se redujo significativamente la movilidad de los espermatozoides (Fernández-Santos et al., 2009). Estas diferencias pueden ser debidas, como afirmó Domínguez-Rebolledo et al., (2011), a factores individuales de los machos. El  $\text{Fe}^{2+}$  es también un potente promotor de la peroxidación lipídica (Martínez-Pastor et al., 2009a).

En nuestro estudio, el tratamiento con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato resultó en un daño evidente en el DNA. En este caso observamos una clara respuesta con dosis crecientes, que se hizo evidente en cada tiempo de muestreo. La muestra tratada con  $10 \mu\text{M}$  apenas sufrió cambios, mientras que la tratada con  $1 \text{ mM}$  tuvo un cambio enorme, que a las 24 h llegó incluso a desaparecer la población principal. En estudios realizados con semen de toro, se observó también un incremento del daño en el DNA del espermatozoide tras la incubación con  $\text{Fe}^{2+}$   $100 \mu\text{M}$  y ascorbato  $1 \text{ mM}$ . Además este incremento del daño fue más elevado con tiempos de incubación mayor, como sucedió en un experimento anterior con ciervo rojo (Fernández-Santos et al., 2009).

En otro estudio en que se analizó el efecto en el DNA de ciervo rojo de diferentes generadores de radicales no se encontró ninguna diferencia en el daño producido por los distintos tratamientos oxidantes en el DNA, incluyendo el  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato a concentraciones de 1 a 100  $\mu\text{M}$  (Martínez-Pastor et al., 2009a). En ese estudio se incubaron las muestras solo 3 h, lo cual pudo haber sido insuficiente para detectar daños en el ADN espermático.

Otra variable que nos proporciona SCSA es el SDDFI (desviación estándar del DFI). En nuestro estudio solamente se incrementó con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato, y más ligeramente en 0,1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato y en 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 24 h. Este resultado es consecuencia de la deformación de la nube de puntos en el citograma del SCSA, que no es muy acusada con otros tratamientos, y que resulta en una mayor desviación de los valores de DFI. En estudios realizados con semen de carnero, se observó que tras la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a diferentes concentraciones (50, 150 y 300  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. No se encontraron diferencias significativas en el valor de SDDFI. En comparación con nuestro experimento, la concentración de peróxido de hidrógeno fue menor (Peris et al., 2007).

En estudios de fertilidad en toros y de toxicología en ratones han mostrado que el valor del SDDFI es un 20-30% más sensible que el DFI (Ballachey et al., 1987). En cambio, en un estudio con semen de toro se observó que el valor SDDFI no era significativo. Se incubó el semen con  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato durante 6 h. Después se analizó el daño mediante SCSA. Y en este caso el valor SDDFI solamente discriminó el semen de uno de los tres toros de la muestra control (Martínez-Pastor et al., 2009b). En humanos, en los resultados preliminares de las investigaciones se ha observado que la desviación estándar de DFI es un 10% más sensible que el DFI en estudios sobre infertilidad (Evenson and Wixon, 2006b).

Por último, la variable HDS en nuestro experimento oscila entre un 10 y un 15%, con un pequeño aumento al transcurrir el tiempo de incubación, y con los tratamientos de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato 0,01 mM y 0,1 mM, así como en Fenton 0,1 M y 1 mM. El tratamiento  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato 1 mM redujo apreciablemente el valor de esta variable, debido a que la fluorescencia verde decreció en las muestras a las que se le aplicó este

tratamiento. En estas muestras, HDS decreció con el tiempo de incubación. En otro estudio (Martínez-Pastor et al., 2009b), con semen de toro, se observó también que el HDS disminuye con el tiempo tras la incubación con  $\text{Fe}^{2+}$ . Esta disminución se asoció a posibles cambios que se producen en la cromatina durante la incubación que afectan a la organización de la cromatina espermática. Evenson and Wixon, (2006) indicaron que el HDS puede indicar la proporción de espermatozoides inmaduros en la muestra. En otro estudio con semen de carnero (García-Macías et al., 2006), se estudiaron las posibles variaciones que presenta el semen de carnero a lo largo del año. Se observó que el valor del parámetro HDS decrecía en verano. Esta disminución puede indicar que hay otros factores, además de la inmadurez de la cromatina espermática, que afectan al valor HDS. Uno de estos factores puede ser en este caso la temperatura ambiental.

En estudios con semen humano, se ha observado que las muestras que presentan el valor de HDS incrementado ( $\text{HDS} > 15\%$ ). Este incremento se relaciona con una disminución en la tasa de fertilización y un mayor tiempo para conseguir una gestación (in vivo o in vitro) (Virro et al., 2004). Por otro lado, el valor de HDS no presenta relación con la tasa de fertilización mediante ICSI (Bungum et al., 2004).

Estas muestras que se han analizado mediante SCSA, se van analizar posteriormente mediante qPCR. Y los resultados obtenidos mediante qPCR se compararan con los obtenidos del SCSA. Es decir, las muestras en las que hemos observado daño deberían resultar en unas PCR menos eficientes, y esta menor eficiencia debería corresponderse al nivel de daño (por ejemplo, el  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato a 3, 6 y 24 h debería dar una eficiencia menor en correspondencia). Esto nos permite ver si la técnica es al menos tan sensible como el SCSA. Además, nos permitirá ver si la qPCR es más sensible. Por ejemplo, esperamos que en todos los tratamientos haya al menos un poco de daño, pero igual con el SCSA no somos capaces de verlo, pero tal vez sí con la qPCR.

## 8. Conclusiones.

En resumen, nuestros resultados muestran claras diferencias entre los generadores de ROS.

El  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato es el que más daño a inducido en el DNA de los espermatozoides de carnero, en comparación con los otros dos.

En el caso del peróxido de hidrógeno, solamente la concentración más elevada (100 mM) y tras 24 h de incubación ha inducido fragmentación del DNA. Aunque debemos tener en cuenta que las concentraciones fueron dos órdenes en magnitud mayores que las utilizadas en los otros tratamientos.

Por último, el reactivo de de Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) indujo daño al DNA a la concentración más elevada (1 mM) y tras 24 h de incubación. No obstante, debemos tener en cuenta que en comparación con el tratamiento  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el reactivo de Fenton fue más agresivo con las muestras. Ya que la utilizamos una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 veces menor.

Este experimento está incluido dentro de una línea experimental, cuyo objetivo es analizar el daño en el DNA de los espermatozoides de carnero mediante qPCR “real time”. Estos resultados servirán como referencia para comparar con los obtenidos mediante la qPCR.

## 9. Bibliografía.

- Agarwal, A., Ikemoto, I., and Loughlin, K.R. (1994). Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swim-up and L4 filtration. *Arch. Androl.* 32, 169–174.
- Aitken, R.J., and Baker, M.A. (2002). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *International Journal of Andrology* 25, 191–194.
- Aitken, R.J., Buckingham, D., and Harkiss, D. (1993). Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 97, 441–450.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S., and Fishel, S. (1989). Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and Human Sperm Function. *Biology of Reproduction* 41, 183–197.
- Aitken, R.J., and Sawyer, D. (2003). The human spermatozoon--not waving but drowning. *Adv. Exp. Med. Biol.* 518, 85–98.
- Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E., and De Paz, P. (2006). Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 30–42.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Fuente, L.F. de la, and Paz, P. de (2005). Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology* 63, 1235–1247.
- Aravindan, G.R., Bjordahl, J., Jost, L.K., and Evenson, D.P. (1997). Susceptibility of Human Sperm to in Situ DNA Denaturation Is Strongly Correlated with DNA Strand Breaks Identified by Single-Cell Electrophoresis. *Experimental Cell Research* 236, 231–237.
- Awda, B.J., Mackenzie-Bell, M., and Buhr, M.M. (2009). Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function. *Biol Reprod* 81, 553–561.
- Ballachey, B.E., Hohenboken, W.D., and Evenson, D.P. (1987). Heterogeneity of Sperm Nuclear Chromatin Structure and Its Relationship to Bull Fertility. *Biol Reprod* 36, 915–925.
- Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., and Davies-Morel, M.C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21, 895–902.

Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., and Meyers, S.A. (2003). Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *Journal of Andrology* 24, 621.

Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L., and Giwercman, A. (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum. Reprod.* 19, 1401–1408.

Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C., Fernández, J.L., and Gosálvez, J. (2007). [Assessing sperm DNA damage]. *Actas Urol Esp* 31, 120–131.

Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromboise, M., De Jonge, C.J., and Carrell, D.T. (2006). Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *J Androl* 27, 53–59.

Domínguez-Rebolledo, A., Martínez-Pastor, F., Bisbal, A., Ros-Santaella, J., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, A., Garde, J., and Fernández-Santos, M. (2011). Response of Thawed Epididymal Red Deer Spermatozoa to Increasing Concentrations of Hydrogen Peroxide, and Importance of Individual Male Variability. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 393–403.

Domínguez-Rebolledo, A.E., Fernández-Santos, M.R., García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Garde, J.J., and Martínez-Pastor, F. (2009). Washing increases the susceptibility to exogenous oxidative stress in red deer spermatozoa. *Theriogenology* 72, 1073–1084.

Eppleston, J., and Maxwell, W.M. (1995). Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. *Theriogenology* 43, 777–788.

Evenson, D., and Jost, L. (2000). Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science* 22, 169–189.

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

Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., and Melamed, M.R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131–1133.

Evenson, D.P., Jost, L.K., and Baer, R.K. (1993). Effects of methyl methanesulfonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell kinetics. *Environ. Mol. Mutagen.* 21, 144–153.

Evenson, D.P., Kasperson, K., and Wixon, R.L. (2007). Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 93–113.

Evenson, D.P., Larson, K.L., and Jost, L.K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 23, 25–43.

Evenson, D.P., Thompson, L., and Jost, L. (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41, 637–651.

Evenson, D.P., and Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65, 979–991.

Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R., and Alvarez, J.G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 24, 59–66.

Fernández-Santos, M.R., Domínguez-Rebolledo, A.E., Estes, M.C., Garde, J.J., and Martínez-Pastor, F. (2009). Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. *Int. J. Androl.* 32, 353–359.

Ford, W.C.. (2004). Regulation of Sperm Function by Reactive Oxygen Species. *Hum. Reprod. Update* 10, 387–399.

García-Macías, V., Martínez-Pastor, F., Alvarez, M., Borrigan, S., Chamorro, C.A., Soler, A.J., Anel, L., and de Paz, P. (2006). Seasonal changes in sperm chromatin condensation in ram (*Ovis aries*), Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and brown bear (*Ursus arctos*). *J. Androl.* 27, 837–846.

Garcia-Macias, V., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Garde, J.J., Anel, E., Anel, L., and de Paz, P. (2006). Assessment of chromatin status (SCSA) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology* 66, 1921–1930.

Gledhill, B.L., Lake, S., Steinmetz, L.L., Gray, J.W., Crawford, Dean, P.N., and Van Dilla, M.A. (1976). Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. *J. Cell. Physiol.* 87, 367–375.

Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., and Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA Strand Breaks and Increased Sensitivity of DNA in Situ to Denaturation in



Abnormal Human Sperm Cells: Analogy to Apoptosis of Somatic Cells. *Experimental Cell Research* 207, 202–205.

Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., and Buckrell, B.C. (1990). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 33, 977–992.

Herrero, M.B., and Gagnon, C. (2001). Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of Andrology* 22, 349.

Herrero, M.B., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2003). Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr. Pharm. Des.* 9, 419–425.

Hinshaw, D.B., Sklar, L.A., Bohl, B., Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Rossi, M.W., Spragg, R.G., and Cochrane, C.G. (1986). Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J Pathol* 123, 454–464.

Hoshi, K., Katayose, H., Yanagida, K., Kimura, Y., and Sato, A. (1996). The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil. Steril.* 66, 634–639.

Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., and Thompson, W. (1996). A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 613–619.

Januskauskas, A., Johannisson, A., and Rodriguez-Martinez, H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60, 743–758.

Kaabi, M., Alvarez, M., Anel, E., Chamorro, C.A., Boixo, J.C., de Paz, P., and Anel, L. (2006). Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology* 66, 1876–1883.

Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G., and Scaramuzzi, R.J. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64, 1225–1235.

Kerton D J, Mc Phee S R, Davis IF, White M B, Banfield JC, Cahill L P (1984). A comparison of insemination techniques in Corridale ewes. *Proc Aust Soc Anim Prod* 15, 701.

de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* *13*, 379–386.

de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., and Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction* *2*, 48.

Lo, C.C., Thompson, J.A., Lowry, V.K., and Varner, D.D. (2002). Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology* *57*, 1135–1142.

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G., and Casper, R.F. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* *13*, 896–900.

Love, C.C. (2005). The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Animal Reproduction Science* *89*, 39–45.

Martínez-Pastor, F., Aisen, E., Fernández-Santos, M.R., Estes, M.C., Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., and Garde, J.J. (2009a). Reactive Oxygen Species Generators Affect Quality Parameters and Apoptosis Markers Differently in Red Deer Spermatozoa. *Reproduction* *137*, 225–235.

Martínez-Pastor, F., Del Rocío Fernández-Santos, M., Domínguez-Rebolledo, Á., Estes, M., Garde, J., and Biology of Reproduction Group (2009b). DNA Status on Thawed Semen from Fighting Bull: A Comparison Between the SCD and the SCSA Tests. *Reproduction in Domestic Animals* *44*, 424–431.

Meyer, J.N. (2010). QPCR: a tool for analysis of mitochondrial and nuclear DNA damage in ecotoxicology. *Ecotoxicology* *19*, 804–811.

Moran, J.M., Madejón, L., Ortega Ferrusola, C., and Peña, F.J. (2008). Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* *70*, 91–96.

Oehninger, S., Blackmore, P., Mahony, M., and Hodgen, G. (1995). Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* *12*, 41–47.

Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A., Gulbrandsen, B., and Berg, K.A. (2004). Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology* *61*, 1719–1727.

Peris, S.I., Bilodeau, J.-F., Dufour, M., and Bailey, J.L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development* *74*, 878–892.

Peris, S.I., Morrier, A., Dufour, M., and Bailey, J.L. (2004). Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J. Androl.* *25*, 224–233.

Perreault, S.D., Barbee, R.R., Elstein, K.H., Zucker, R.M., and Keefer, C.L. (1988). Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biol. Reprod.* *39*, 157–167.

Poccia, D. (1986). Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int. Rev. Cytol.* *105*, 1–65.

Ramos, L., and Wetzels, A.M. (2001). Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum. Reprod.* *16*, 1703–1707.

Rhoades, R., Pflander, R. (1996) *Human Physiology*, 3rd edn. Harcourt Brace and company, Orlando.

Salamon, S., and Maxwell, W.M.. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* *62*, 77–111.

Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* *37*, 185–249.

Schakell, G.H., Kyle, B., and Littlejohn, R.P. (1990). Factors influencing the success of a large scale artificial insemination programme in sheep. *50*, 427–430.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* *175*, 184–191.

de la Torre, J., López-Fernández, C., Pita, M., Fernández, J.L., Johnston, S.D., and Gosálvez, J. (2007). Simultaneous observation of DNA fragmentation and protein loss in the boar spermatozoon following application of the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *J. Androl.* *28*, 533–540.

Virro, M.R., Larson-Cook, K.L., and Evenson, D.P. (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril.* *81*, 1289–1295.

Vishwanath, R. (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* *59*, 571–584.

Ward, W.S., and Coffey, D.S. (1991). DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells. *Biology of Reproduction* 44, 569–574.

Windsor, D.P., Széll, A.Z., Buschbeck, C., Edward, A.Y., Milton, J.T.B., and Buckrell, B.C. (1994). Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 42, 147–157.

## Anexo 1. Composición de los medios y soluciones utilizados.

Salvo que se indique lo contrario, todos los medios se preparan con agua milli-Q.

Tabla 1. Medio de congelación. Diluyente de congelación.

<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (mM si no se indica otra unidad)</b>
TES (Sigma T-6022)	218
Tris (Sigma T-1410)	58
Fructosa (Sigma F-3510)	11
Yema de huevo clarificada	10% (v/v)
Glicerol (Sigma G-5516)	4% (v/v)

pH: 7,2; osmolaridad antes de añadir yema de huevo y glicerol: 320 mOsm/kg

Tabla 2. Stock Fe<sup>2+</sup>/ascorbato.

<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (mM si no se indica otra unidad)</b>
FeSO <sub>4</sub> (Sigma F8048)	10
Ascorbato sódico (Sigma A4034)	100

Tabla 3. Stock H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 M.

<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (M si no se indica otra unidad)</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Sigma H1009)	1

Tabla 4. Stock Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (mM si no se indica otra unidad)</b>
FeSO <sub>4</sub> (Sigma F8048)	10
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Sigma H1009)	10

Tabla 5. TALP- Hepes. Medio TALP (Tyrode-Albumin-Lactate-Pyruvate) con Hepes como tampón.

<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (mM si no se indica otra unidad)</b>
NaCl (Sigma S5886)	100
KCl (Sigma P5405)	3,1
CaCl <sub>2</sub> (Sigma C7902, dihidrato)	3
MgCl <sub>2</sub> (Sigma M8266, anhidro)	0,4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma S9638, monohidrato)	0,3
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma S5761)	25
Lactato de sodio (Sigma L4263, sirope 60%)	21,6
Piruvato de sodio (Sigma P4562)	1
Glucosa (Sigma G8270)	5
HEPES (free acid) (Sigma H4034)	10
BSA (Sigma A3311)	5 mg/mL
Gentamicina (Sigma G1397)	10 mg/L

Tabla 6. Glutaraldehido 2%. Agente fijador de los espermatozoides.

<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (mM si no se indica otra unidad)</b>
Glucosa (Sigma G8270)	0,16
Citrato de sodio (Sigma C0909)	0,03
Bicarbonato de sodio (Sigma S5761)	0,02

Tabla 7. Stock 10X de TNE (Tris/ NaCl/EDTA) es un medio tamponado que se utiliza para diluir las muestras seminales antes de congelarlas. Se diluye 10 veces antes de su uso.

<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (mM si no se indica otra unidad)</b>
Tris- HCl (Sigma T5941)	100 mM
NaCl (Sigma S9625)	1,5 M
EDTA disódico (Sigma E1644)	10 mM

Se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 2 N.

Tabla 8. Medio detergente-ácido para SCSA. Permeabiliza las membranas de los espermatozoides y el pH bajo desnaturaliza el DNA donde la cromatina es más laxa o la doble está rota.

<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (mM si no se indica otra unidad)</b>
NaCl (Sigma S9625)	150
Triton X- 100 (Sigma T9284)	0,1% v/v
HCl 2 N (Sigma H1758)	80

Se ajusta el pH a 1,2.

Tabla 9. Solución de tinción para SCSA. El naranja de acridina es un colorante metacromático. Emite color verde cuando se une a DNA de doble hebra, y de color rojo cuando se une a DNA de hebra sencilla.

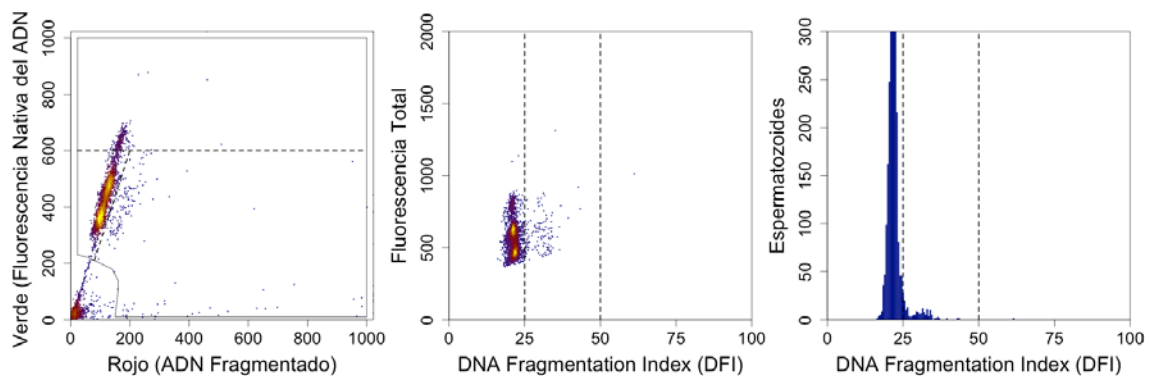
<b>Productos químicos</b>	<b>Concentración final (mM si no se indica otra unidad)</b>
NaCl (Sigma S9625)	150
Ácido cítrico (Sigma C0759)	100
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma S0876)	200
EDTA disódico (Sigma E6635)	1
Naranja de acridina alta pureza Polysciences (Acridine orange, CI 46005 en solución a 1 mg/mL en H <sub>2</sub> O)	0,02

Se ajusta el pH 6 con NaOH concentrado.

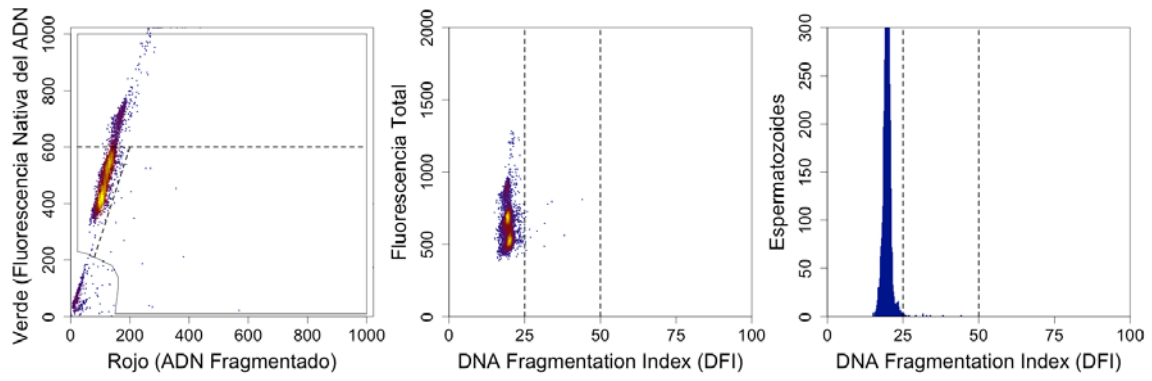


## Anexo II. Datos obtenidos del análisis de citometría de flujo.

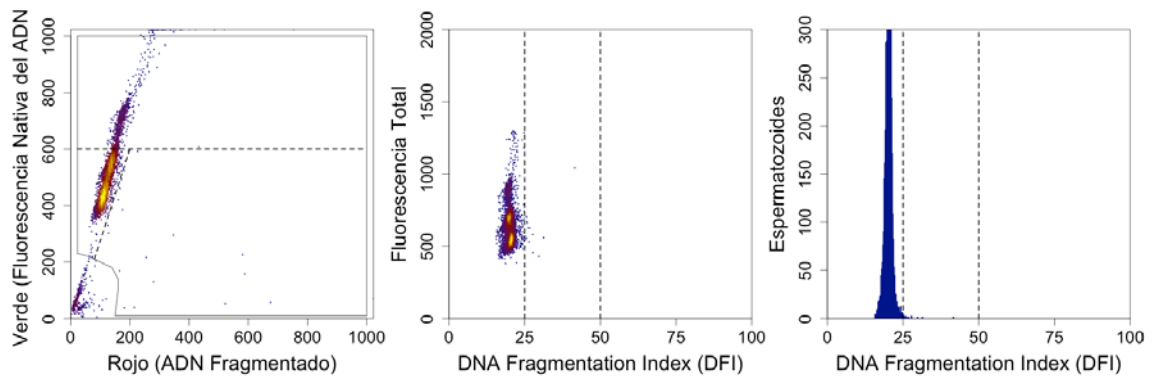
En este anexo se muestran los citogramas obtenidos del análisis por citometría de flujo. En cada figura el citograma de la izquierda muestra los eventos capturados según su fluorescencia roja y verde (la escala muestra canales de fluorescencia, en una escala lineal). En este citograma, los eventos cercanos al origen son descartados (ruido, restos celulares, restos de diluyente, etc.). Se puede apreciar una población principal (cromatina no alterada) a la izquierda y, a la derecha de la línea diagonal de trazos, las células fuera de la población principal (COMP), con cromatina alterada (incremento de la fluorescencia roja sobre la verde). Los eventos por encima de la línea horizontal (fluorescencia verde sobre el canal 600) forman parte del HDS (proporción de espermatozoides con alta tinción del ADN, posiblemente con cromatina laxa). El citograma central enfrenta los valores de DFI (calculados a partir de los valores verdes y rojo de cada espermatozoide) con los valores de fluorescencia total. Se aprecia claramente la nube de puntos que forman las COMP, a la derecha del límite de 25% del DFI. En este estudio hemos establecido dos límites para calcular la proporción de espermatozoides en COMP. La variable mDFI es el porcentaje de espermatozoides con DFI mayor de 25% pero menor de 50%, y hDFI es el porcentaje de espermatozoides con DFI mayor de 50%. A la derecha se muestran los histogramas de DFI, distinguiéndose el pico de la población principal y las células con DFI más alto formando una prolongación o un segundo pico a la derecha.



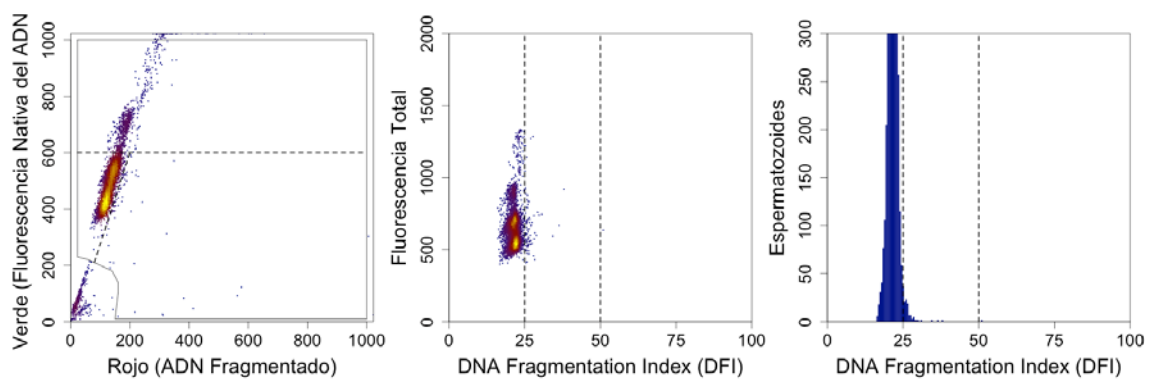
Citograma A1. Muestra control 0 h.



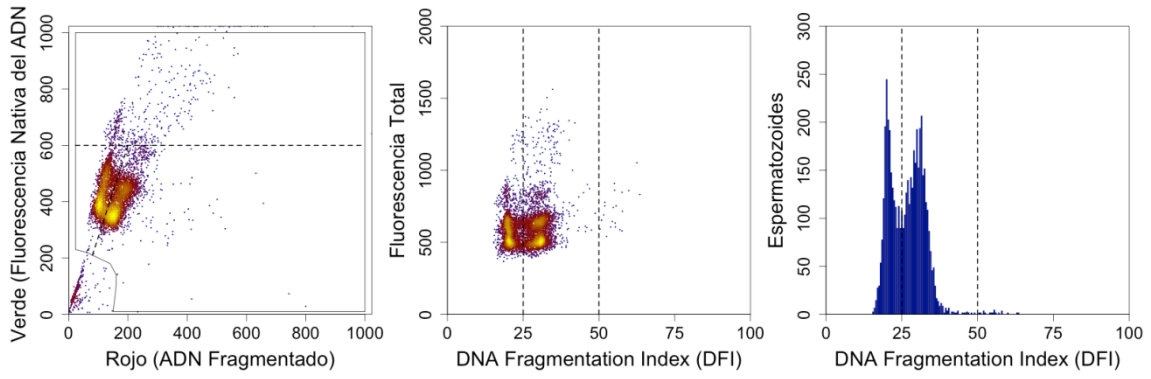
Citograma A2. Muestra control 3 h.



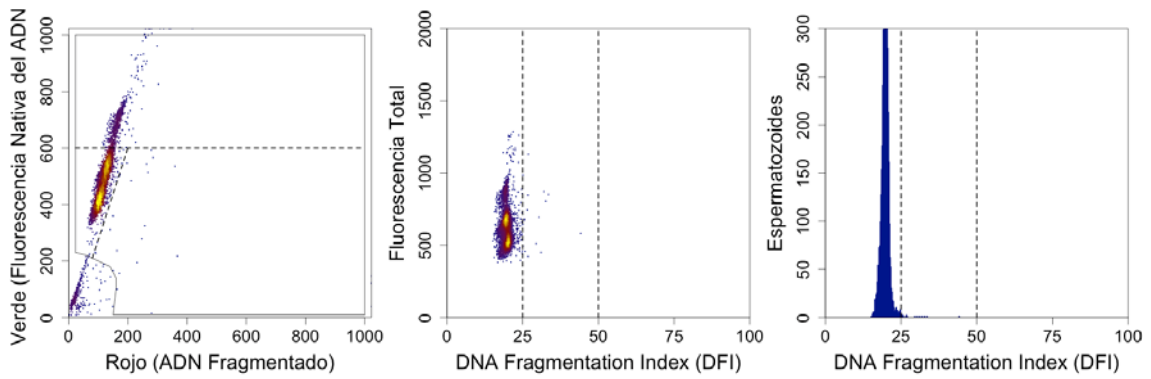
Citograma A3. Muestra tratada con 10 μM de Fe<sup>2+</sup>/ascorbato e incubada durante 3 h a 37 °C.



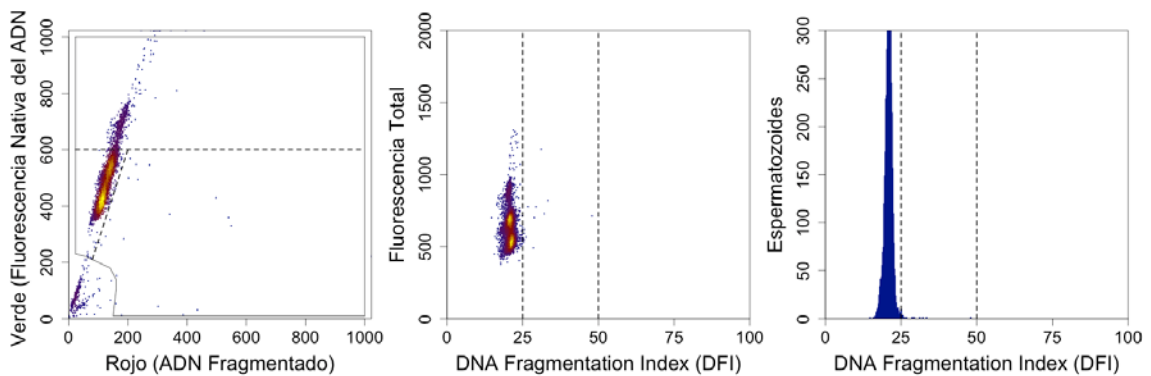
Citograma A4. Muestra tratada con 100 μM de Fe<sup>2+</sup>/ascorbato e incubada durante 3 h a 37 °C.



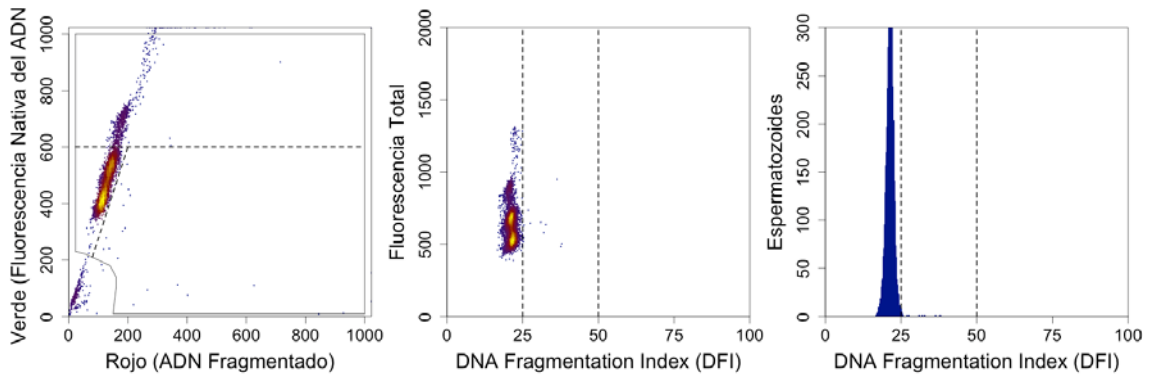
Citograma A5. Muestra tratada con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato e incubada durante 3 h a 37 °C.



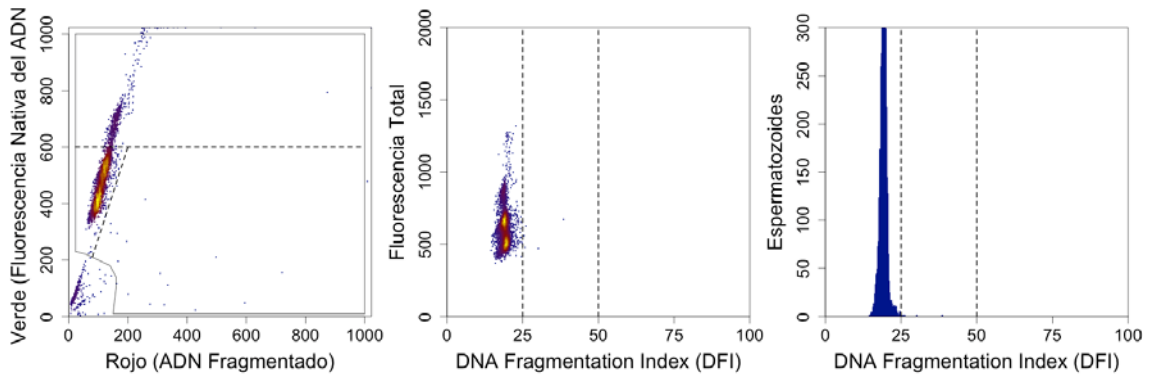
Citograma A6. Muestra tratada con 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 3 h a 37 °C.



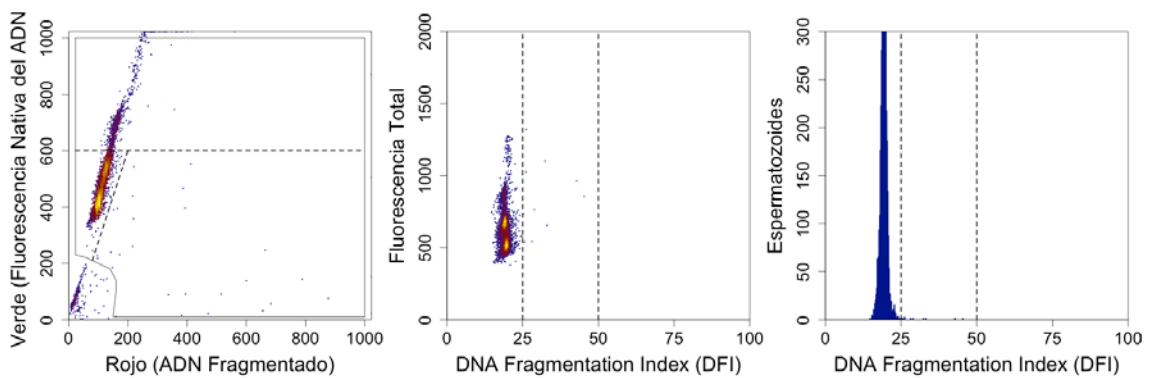
Citograma A7. Muestra tratada con 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 3 h a 37 °C.



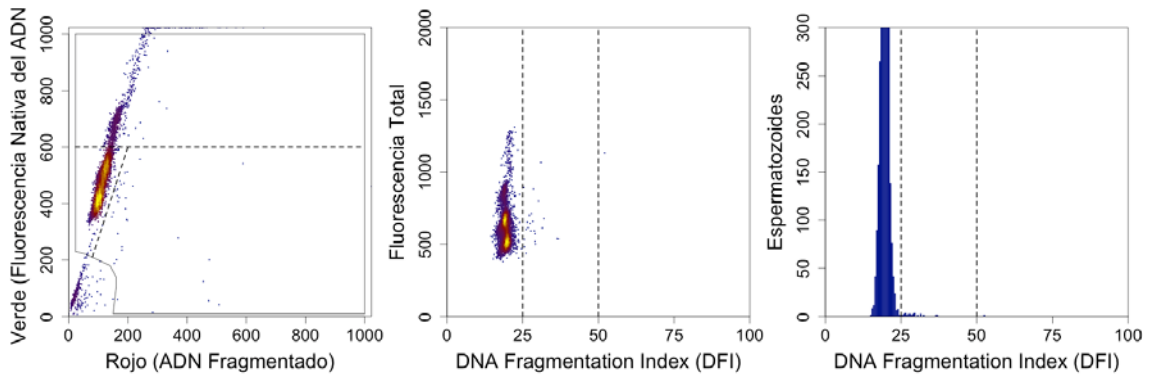
Citograma A8. Muestra tratada con 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubada durante 3 h a 37 °C.



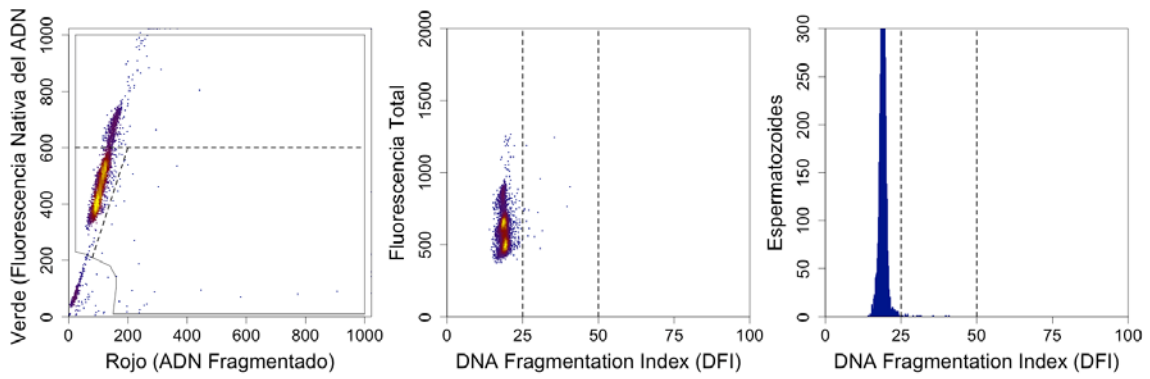
Citograma A9. Muestra tratada con 10 μM de Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubada durante 3 h a 37 °C.



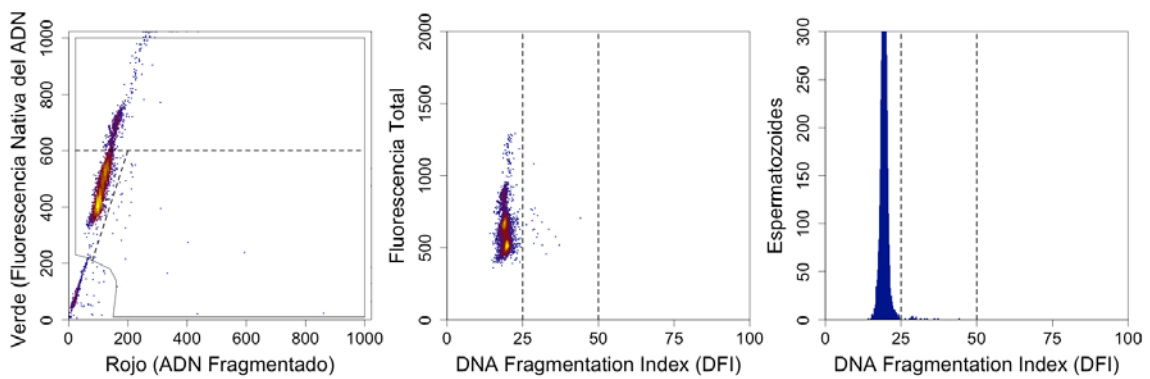
Citograma A10. Muestra tratada con 100 μM de Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubada durante 3 h a 37 °C.



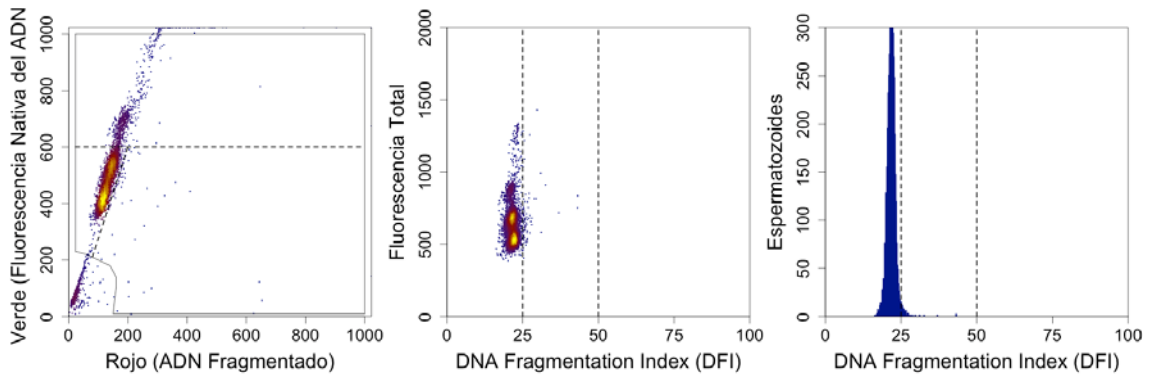
Citograma A11. Muestra tratada con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 3 h a 37 °C.



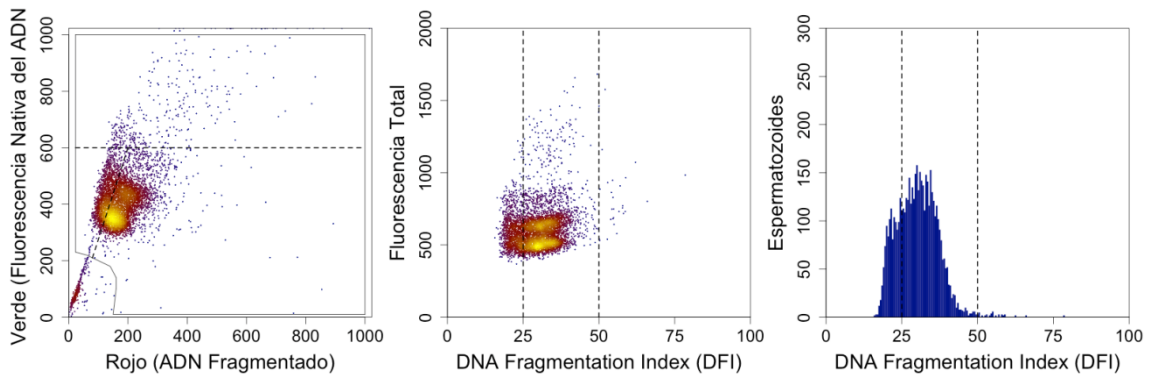
Citograma A12. Muestra control 6 h.



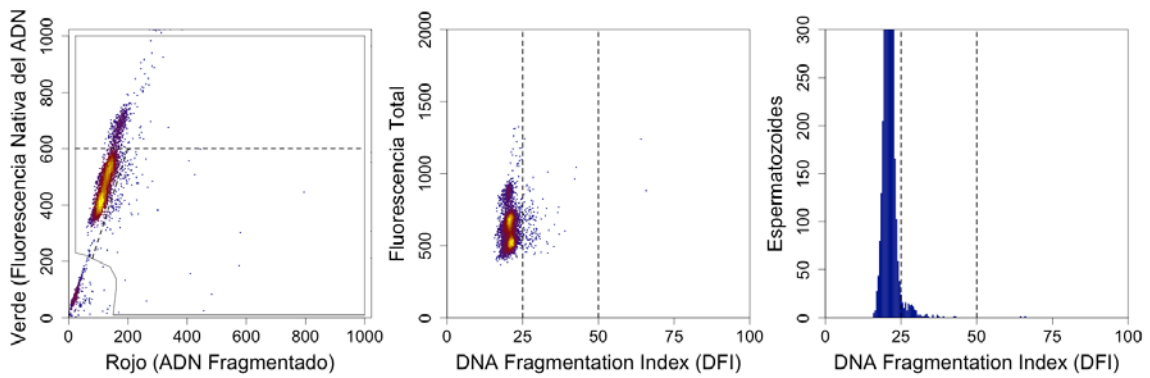
Citograma A13. Muestra tratada con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato e incubada durante 6 h a 37 °C.



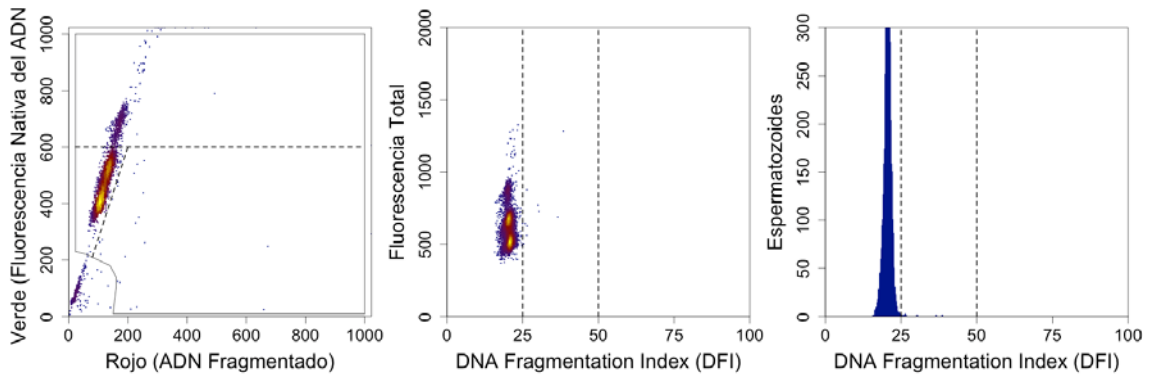
Citograma A14. Muestra tratada con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato e incubada durante 6 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ .



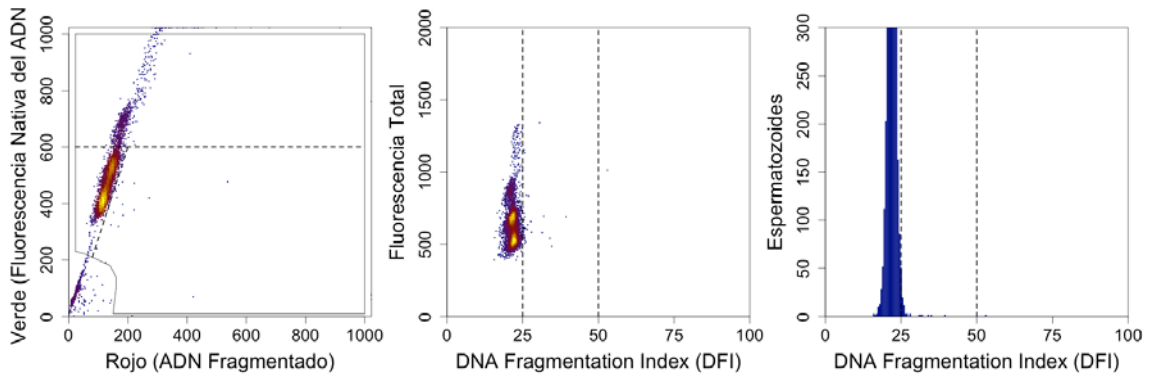
Citograma A15. Muestra tratada con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato e incubada durante 6 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ .



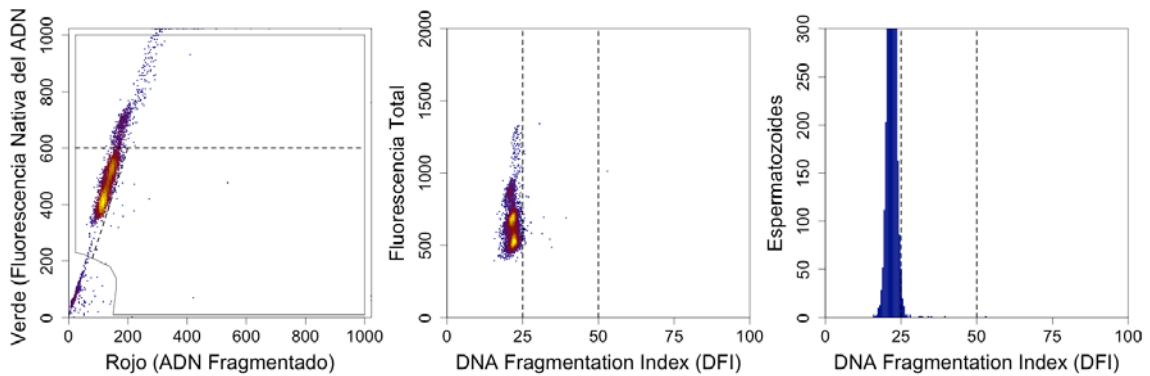
Citograma A16. Muestra tratada con 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 6 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ .



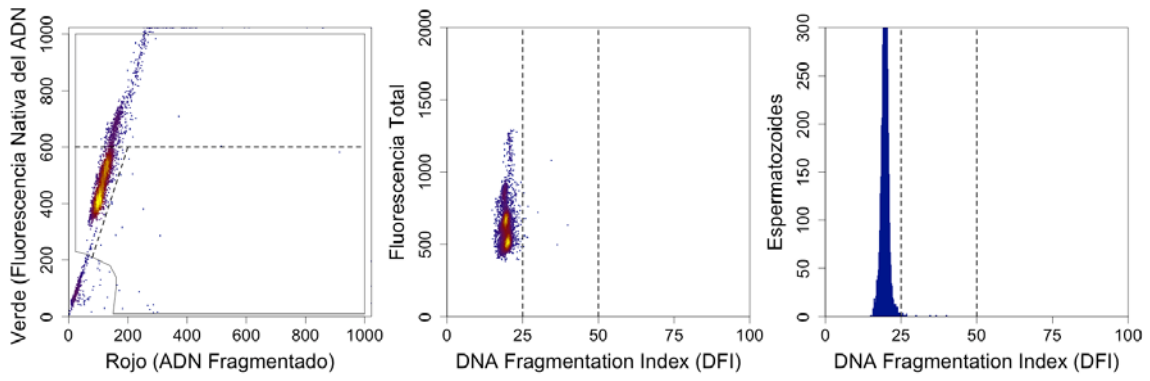
Citograma A17. Muestra tratada con 10 mM de  $H_2O_2$  e incubada durante 6 h a 37 °C.



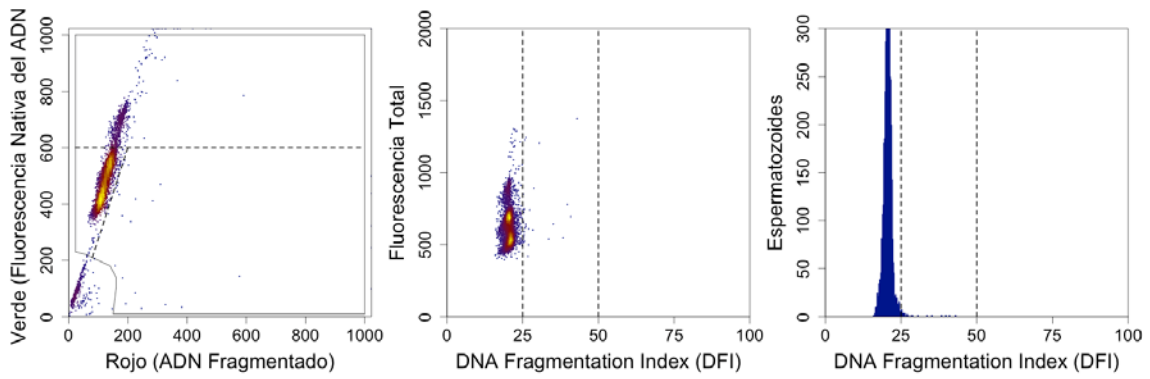
Citograma A18. Muestra tratada con 100 mM de  $H_2O_2$  e incubada durante 6 h a 37 °C.



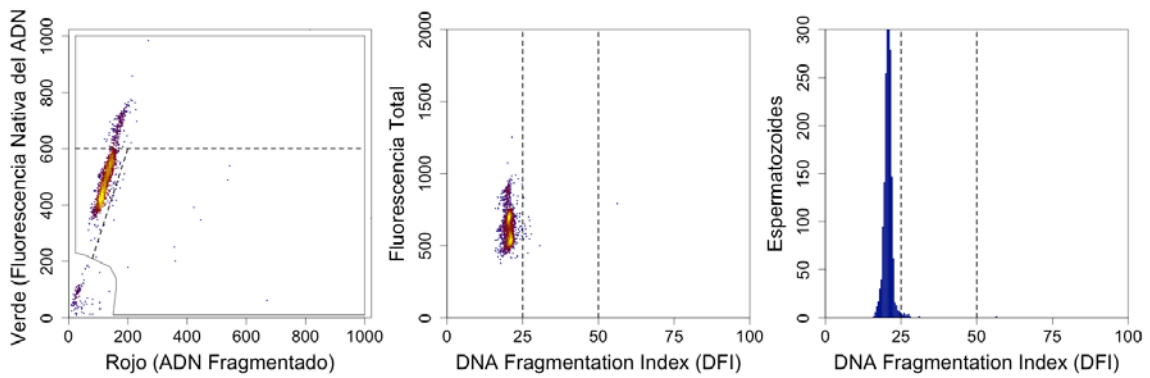
Citograma A19. Muestra tratada con 10  $\mu M$  de  $Fe^{2+}/H_2O_2$  e incubada durante 6 h a 37 °C.



Citograma A20. Muestra tratada con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 6 h a 37  $^\circ\text{C}$ .

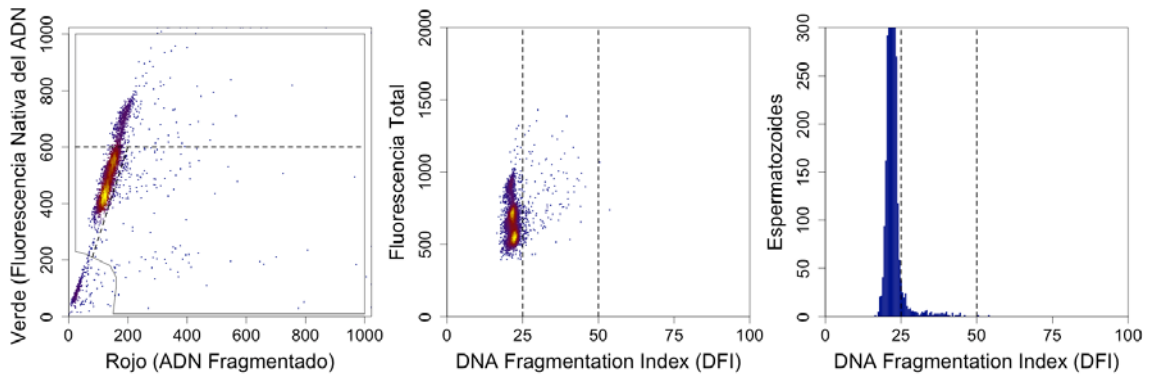


Citograma A21. Muestra tratada con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 6 h a 37  $^\circ\text{C}$ .

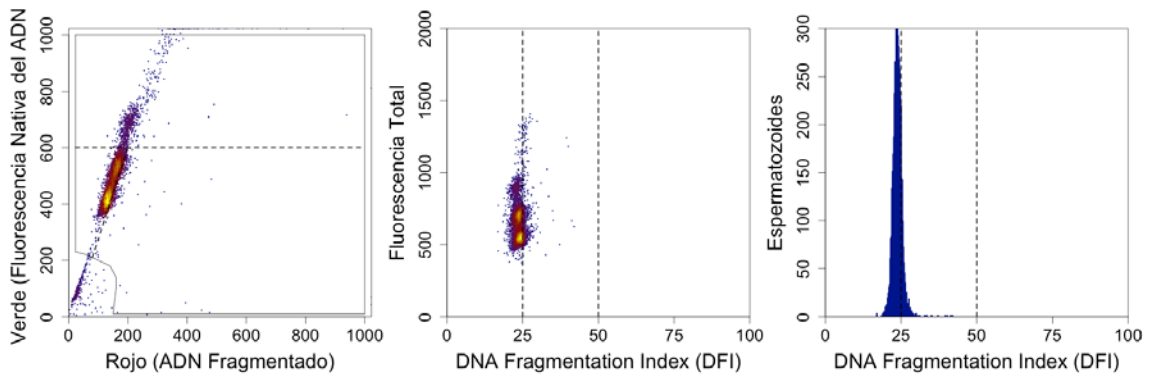


Citograma A22. Control 24 h.

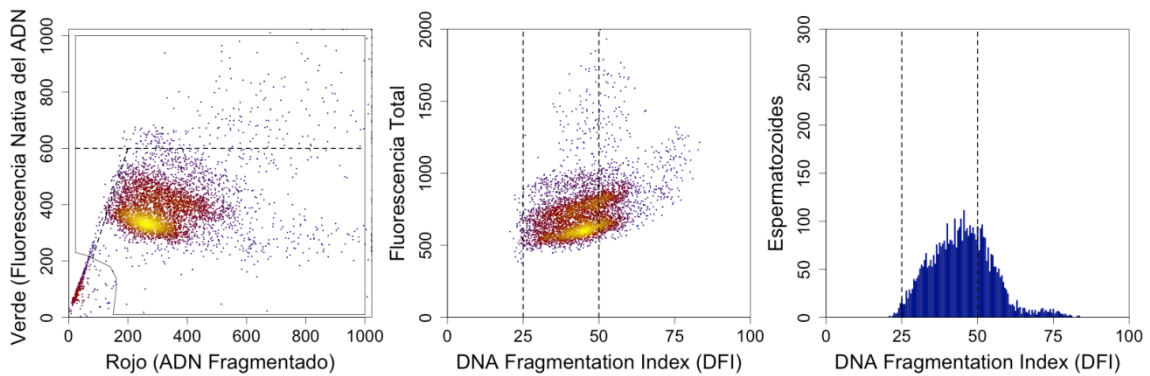




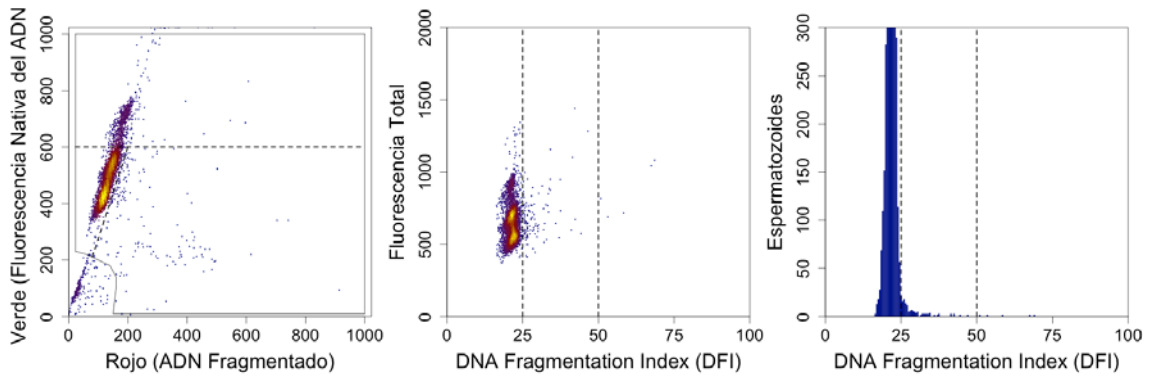
Citograma A23. Muestra tratada con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato e incubada durante 24 h a 37 °C.



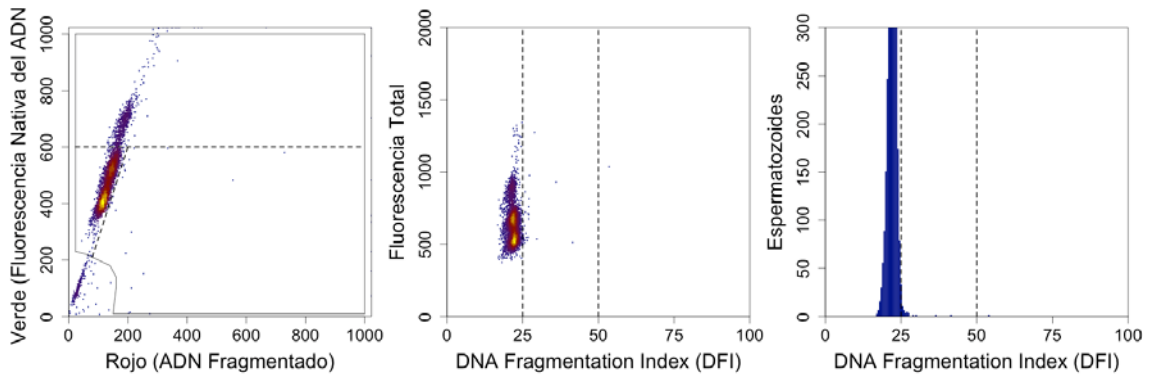
Citograma A24. Muestra tratada con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato e incubada durante 24 h a 37 °C.



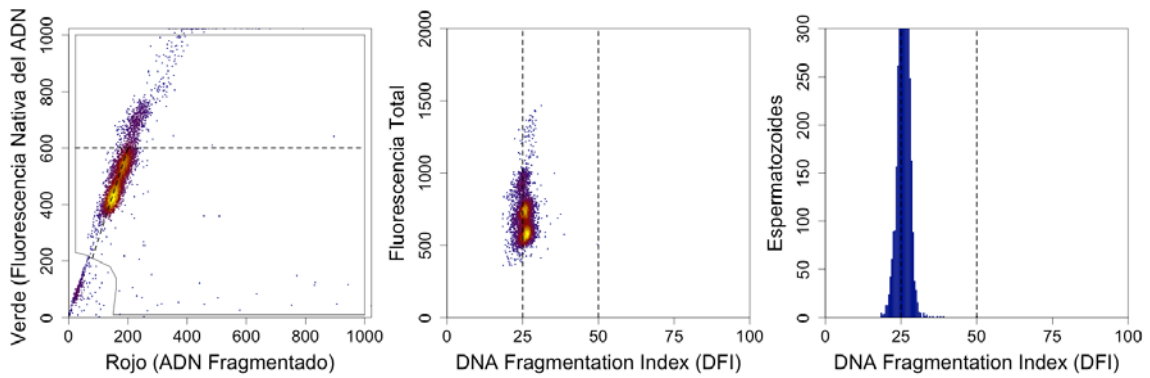
Citograma A25. Muestra tratada con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbato e incubada durante 24 h a 37 °C.



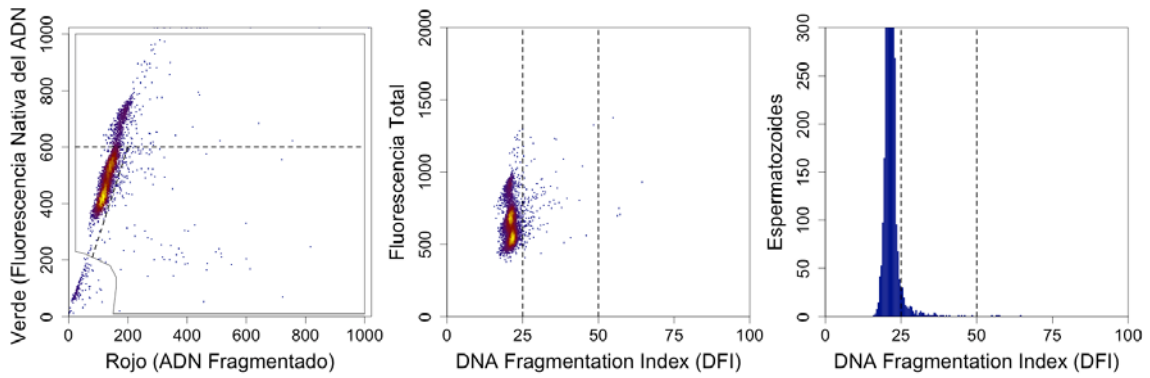
Citograma A26. Muestra tratada con 1 mM de  $H_2O_2$  e incubada durante 24 h a 37 °C.



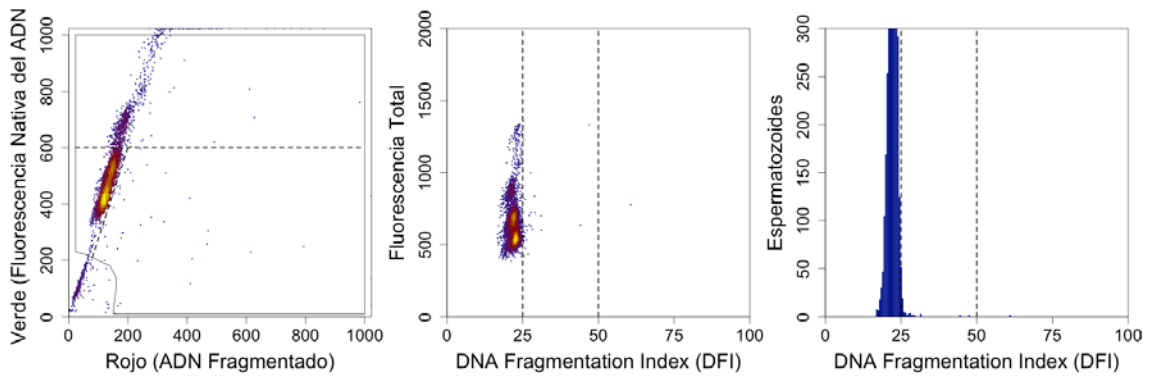
Citograma A27. Muestra tratada con 10 mM de  $H_2O_2$  e incubada durante 24 h a 37 °C.



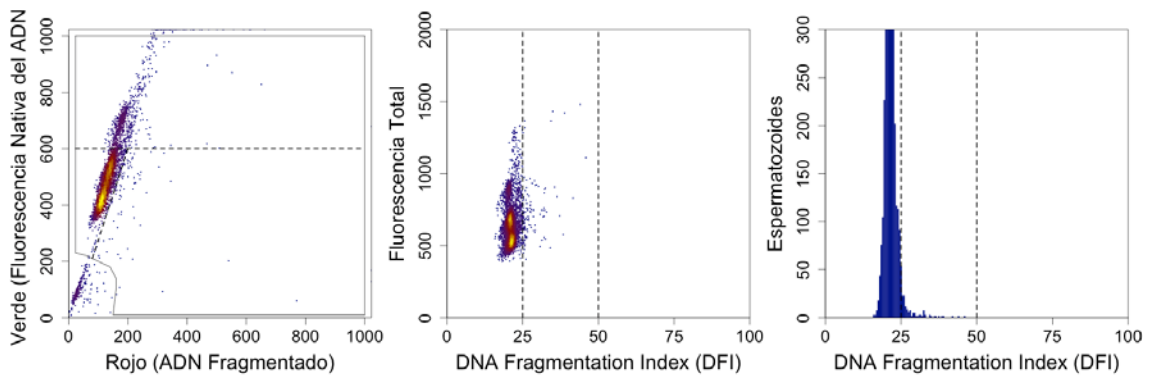
Citograma A28. Muestra tratada con 100 mM de  $H_2O_2$  e incubada durante 24 h a 37 °C.



Citograma A29. Muestra tratada con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 24 h a 37  $^\circ\text{C}$ .



Citograma A30. Muestra tratada con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 24 h a 37  $^\circ\text{C}$ .



Citograma A31. Muestra tratada con 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  e incubada durante 24 h a 37  $^\circ\text{C}$ .