



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL**

**COMPARACIÓN DE TÉCNICAS PARA EVALUAR LA  
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN  
OVINOS DE PELO**

**REPOSITORIO**

Que presenta:

**María Fernanda Soza Mata**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical**

Director de tesis:

**Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde**

Conkal, Yucatán, México

Junio, 2023



**TecNM**



Conkal, Yucatán, México, a 19 de junio de 2023

El comité de tesis del candidato a grado: María Fernanda Soza Mata, constituido por los CC. Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde, Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo, Dr. Roberto Zamora Bustillos y Dr. Luis Leonardo Pinzón López, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Comparación de técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático en ovinos de pelo**, que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

**ATENTAMENTE**

Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde

Director de Tesis

Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo

Co-director de Tesis

Dr. Roberto Zamora Bustillo

Asesor de Tesis

Dr. Luis Leonardo Pinzón López

Asesor de Tesis



Conkal, Yucatán, México a 19 de junio de 2023.

## DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

María Fernanda Soza Mata

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	3
ABSTRACT .....	4
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1.1 Introducción.....	5
1.2 Antecedentes.....	7
<b>1.2.2 Reproducción asistida en ovinos de pelo .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2.1 Factores generales que intervienen en la fertilidad del ganado ovino .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2.2 Componentes que intervienen en el desarrollo sexual del ganado ovino .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.3 Formación del espermatozoide.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.3.1 Espermatogénesis.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3.2 Espermiogénesis .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.3.3 Maduración en el epidídimo .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.3.4 Capacitación.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.4 ADN del espermatozoide .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.4.1 Diferencias con las células somáticas.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.4.2 Compactación del ADN espermático.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.4.2.1 Protaminas.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.4.2.2 Función de la protamina en la compactación del ADN espermático .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.5 La fragmentación del ADN espermático .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.5.1 Etiología de la fragmentación del ADN espermático .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.5.1.1 Empaquetamiento anormal de la cromatina espermática.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.5.1.2 Apoptosis defectuosa antes de la eyaculación .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.5.1.3 Producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el eyaculado .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.5.1.4 Otros factores .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.6 Evaluación de la fragmentación del ADN espermático .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.6.1 Técnicas de análisis para la fragmentación del ADN espermático .....</b>	<b>22</b>
1.2.6.1.1 Test de Azul de Toluidina (AT).....	23
1.2.6.1.2 Test de Azul de Anilina (AA).....	24
1.2.6.1.3 Test de Naranja de Acridina (NA) .....	25
1.2.6.1.4 Test de cromomicina A3 (CMA3).....	26
1.2.6.1.5 Test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) .....	27

1.3 Hipótesis .....	29
1.4 Objetivos.....	30
1.4.1 Objetivo general .....	30
1.4.2    Objetivos específicos .....	30
1.5 Procedimiento metodológico .....	31
<b>1.5.1 Localización del área del trabajo</b> .....	31
<b>1.5.2 Diagrama del procedimiento experimental</b> .....	32
2.2 Abstract.....	34

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

### CAPITULO I

Figura 1.1 Diagrama de la espermatogenesis .....	11
Figura 1.2 Pasos de la espermatogénesis, mostrando desde el paso 1 a 14 los de espermiogénesis, ilustrando la fase de Golgi (pasos 1 a 3), la fase de encasquetamiento (pasos 4 a 7), la fase acrosomica (pasos 8 a 12) y la fase de maduración (pasos 13 y 14). .....	12
Figura 1.3 Representación esquemática comparativa entre la estructura de la cromatina de la célula somática y la de la célula espermática.....	14
Figura 1.4 Esquema de elementos que componen estructuralmente la cromatina .....	15
Figura 1.5 Esquemización de los cambios que ocurren en la cromatina durante el intercambio de complejo nucleohistonas a nucleoprotaminas en la fase de espermiogénesis. ....	17

## RESUMEN

El estudio de la integridad del ADN (IADN) del espermatozoide es un parámetro importante de la calidad seminal y de la fecundidad. Sin embargo, algunas de las técnicas que se utilizan actualmente para medir el daño del ADN espermático presentan una baja reproductibilidad entre los resultados y entre las especies. El objetivo de este trabajo fue evaluar 5 técnicas de fragmentación del ADN en muestras espermáticas descongeladas de ovinos de pelo sometidas a fragmentación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se descongelaron 36 pajuelas de 4 sementales de la raza Blackbelly, se mezclaron (pool), se diluyeron en PBS a una concentración de  $\sim 30 \times 10^6$  espermatozoides/mL y se dividieron en tres tratamientos: T0: muestra sin oxidante (considerada como 0% de ADN dañados), T100: muestra incubada con 300  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 horas (inducción de fragmentación de ADN (100%). Posteriormente, la mitad de del T0 y T100 se mezclaron para obtener una proporción del 50% de espermatozoides con ADN fragmentado (T50). Las muestras se analizaron con las diferentes técnicas: Azul de Anilina (AA), Azul de Toluidina (AT), Naranja de Acridina (NA), Cromomicina A3 (CMA3) y Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD). En todas las técnicas, las regresiones lineales presentaron un nivel de significancia menor al 5%, así como una correlación significativa ( $r=0.962$ ,  $P<0.01$ ). Sin embargo, entre tratamientos se observó que la técnica NA ( $34.82 \pm 3.00\%$ ) en el T50 y la técnica de AA ( $89.55 \pm 1.45\%$ ) en el T100, fueron las que menor sensibilidad presentaron para detectar daños en el ADN en comparación con las otras técnicas. En conclusión, aunque las técnicas que mejor evalúan la IADN del espermatozoide en ovino de pelo son la CMA3, SCD y AT; la técnica de AT presenta un menor tiempo de elaboración y un mayor tiempo de almacenamiento de las muestras, además de ser más económica al no requerir tinciones de fluorescencia, ni equipo sofisticado para su análisis.

Palabras clave: ADN, Fragmentación, Técnicas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ovino

## **ABSTRACT**

The study of the DNA integrity (IADN) of the sperm is an important parameter of seminal quality and fertility. However, some of the techniques currently used to measure DNA damage spermatozoa present a low reproducibility between the results and between the species. The objective of this work was to evaluate five DNA fragmentation techniques in sperm samples thawed hair sheep subjected to fragmentation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thirty-six thawed straws from 4 Blackbelly stallions were mixed (pooled), diluted in PBS to a concentration of  $\sim 30 \times 10^6$  spermatozoa/mL and divided into three treatments: T0: sample without oxidant (considered as 0% DNA damage); T100: sample incubated with 300  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hours (induction of DNA fragmentation (100%)), subsequently, half of T0 and T100 were mixed to obtain a 50% proportion of sperm with DNA fragmented (T50). The samples were analyzed with the different techniques: Blue Aniline (AB), Blue Toluidine (TB), Orange Acridine (OA), Chromomycin A3 (CMA3) and Sperm Chromatin Dispersion (SCD). In all the techniques, the linear regressions presented a significance level less than 5%, as well as a correlation significant ( $r=0.962$ ,  $P<0.01$ ). However, between treatments it was observed that the OA technique ( $34.82 \pm 3.00\%$ ) at T50 and the of AB ( $89.55 \pm 1.45\%$ ) in T100, were the ones with the lowest sensitivity to detect DNA damage compared to the other techniques. In conclusion, although the techniques that best evaluate the IADN of spermatozoa in hair sheep are CMA3, SCD and TB; however, the TB technique has a shorter processing time and longer storage time of the samples, in addition to being more economical since it does not require fluorescence stains and sophisticated equipment for analysis.

Keywords: DNA, Fragmentation, Techniques, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sheep

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 Introducción

En la actualidad el estudio de la integridad del ADN (IADN) del espermatozoide ha ido cobrando importancia en los sistemas de producción, para poder predecir la fertilidad de un semental, ya que un espermatozoide con daño tiene la capacidad de fertilizar ovocitos, sin embargo, ocurren fallas en el desarrollo embrionario, pero aún no ha sido muy relevante el estudio en la especie ovina del trópico, ya que no es llevada a cabo de manera rutinaria, por lo que llega a ser un factor sobre la fertilidad de los rebaños, y a su vez, ocasionar un retraso en la producción y rentabilidad tanto de pequeños como medianos productores.

El estudio sobre la IADN del espermatozoide se ha encontrado asociado con anomalías en los parámetros seminales convencionales (Álvarez-Gonçalves *et al.*, 2015; Arbaiza-Barnechea y Cabrera-Villanueva, 2021; Czubaszek *et al.*, 2020). En otros casos, sin embargo, se ha visto que la fragmentación del ADN espermático es independiente de estos parámetros sugiriendo que su evaluación podría proporcionar información adicional (Fraser, 2004; Arbaiza-Barnechea y Cabrera-Villanueva, 2021; Evenson, 2016; Huanca *et al.*, 2020).

Se ha considerado que el origen de la fragmentación del ADN espermático no es fácil de descifrar, ya que existen una variedad de factores extrínsecos e intrínsecos involucrados. Entre ellos se considera que la principal causa es el estrés oxidativo, evento molecular que ocurre cuando existe un desequilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la defensa antioxidante. Diversas investigaciones han demostrado que durante el proceso de criopreservación existe un incremento significativo en la producción de ROS (Alves *et al.*, 2015; Evenson, 2016; Hamilton y Assumpção, 2019).

Se disponen de varias técnicas para evaluar la IADN del espermatozoide: de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) (Evenson, 2016), ensayo COMETA (Kumaresan *et al.*, 2020), hibridación fluorescente in situ (DBD-FISH) (Enciso *et al.*, 2006), marcado de extremos libres por dUTP (TUNEL) (Küçük, 2018) y de traducción in situ de extremos libres (ISNT) (Kim y Tanrikut, 2018). Sin embargo, la mayoría requieren de reactivos y equipamiento complejos, las cuales son costosas y poco llevadas a cabo a la práctica en animales de interés productivo. Actualmente se cuentan con técnicas más sencillas y menos costosas, con facilidad de llevar a cabo a la práctica: Naranja de Acrdina (NA) (Czubaszek *et al.*, 2020), Azul de Toluidina (AT) (Nasr-Esfahani y Tavalae, 2021), Azul



de Anilina (AA) (Nava-Trujillo *et al.*, 2016), Comomicina A3 (CMA3) (Hamilton y Assumpção, 2019) y Dispersión de la Cromatina espermática (SCD) (Arbaiza-Barnechea y Cabrera-Villanueva, 2021; Peris-Frau *et al.*, 2019); las cuales son simples, rápidas, reproducibles y permiten evaluar la IADN del espermatozoide utilizando en su mayoría la microscopía óptica, sin embargo, la reproducibilidad y precisión siempre varían según la técnica y especie a evaluar. Por ello, es importante el estudio de varias pruebas de fertilidad, para conocer cuáles son las más precisas en la especie ovina del trópico, permitiendo una mejor selección y cruzamiento de machos de alta calidad genética, siendo animales de interés, al llevarse a cabo las diversas Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), con el fin de eliminar reproductores con menor capacidad de fecundación.

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.2 Reproducción asistida en ovinos de pelo

Actualmente las razas ovinas de pelo han generado importancia en México por ser adaptables a diversas condiciones ambientales. La población de estas razas ha ido en aumento principalmente en climas cálidos, como templados y secos de varias regiones del país, en donde los productores valoran sus características reproductivas, como la poca estacionalidad de los ovinos de pelo que les permite mejorar sus índices productivos y reproductivos, es por ellos que al seleccionar progenitores con características fenotípicas y genotípicas deseadas permiten mejorar la calidad y productividad de la especie (González *et al.*, 2010; Delgado, 2013).

Al contrario de los bovinos, esta especie tiene una serie de ventajas, como una buena capacidad reproductiva, intervalo entre partos reducido, más de una cría por parto, mejor manejo sobre el estrés calórico, elevada conversión alimenticia, buena resistencia a alturas, entre otras (Serrano, 2011).

Entre una de las técnicas de reproducción más utilizada en la Inseminación Artificial (IA), la cuál es una herramienta importante en la producción ganadera, ya que permite el mejoramiento genético de la descendencia. Es por ello, que es la principal técnica utilizada a nivel mundial en los centros de producción ganadera. Es así, que es de importancia realizar estudios que permitan evaluar, seleccionar y conservar muestras de semen de buena calidad que permitan buenas tasas de fertilidad (Delgado, 2013).

Algunas de las razas de pelo ovinas que presentan buenos parámetros reproductivos son la Pelibuey, que es considerado un animal con excelentes índices de fertilidad, poseer un buen comportamiento materno y que se encuentra como una de las razas con alternativas para mejorar la producción en pie de cría; en el caso del Blacbelly al ser un animal prolífico no estacional posee una excelente habilidad materna así como el Katahdin, pero este último tiene como ventaja el no ser estacional en celos y no tener dificultades en los partos; en el caso de los Dorper son una de las razas con ausencia de cuernos, además de mostrar ser una raza con buena adaptabilidad, con un acelerado crecimiento y una alta reproducción; también son de importancia las cruzas resultantes de estas razas, ya que llegan a ser mejores reproductivamente que las razas puras definidas (Serrano, 2011).

Sin embargo, en México el manejo de los ovinos en los trópicos ha sido deficiente, ya que no se le ha dado importancia a esta especie y por ende no se han generado estrategias

que permitan mejorar en el ámbito reproductivo y genético, ya que son una necesidad en muchos sistemas de producción ovina por la carencia del uso de técnicas de reproducción asistida (González *et al.*, 2010).

#### **1.2.2.1 Factores generales que intervienen en la fertilidad del ganado ovino**

La infertilidad en los animales es definida como aquella incapacidad que tienen para reproducirse o concebir crías, existen algunos factores entre los que se destacan las fallas genéticas, el status sanitario, edad, raza, el tiempo que transcurre entre el parto y la cubrición ya sea por monta natural o por la aplicación de alguna biotecnología, la estacionalidad y baja condición corporal, tanto en hembras como en machos (Gómez, 2012; Izquierdo *et al.*, 2020).

En la hembra se encuentra más marcada la estacionalidad, por lo que es el principal factor sobre su fertilidad, la edad, los días que transcurran entre el parto y la aplicación de alguna técnica reproductiva si es el caso o monta natural, sin dejar de lado el efecto de la sincronización sobre los estros mediante el uso de tratamientos hormonales; además la variación de índices reproductivos entre granjas, entre los que se encuentran los intervalos entre partos, la estación de las cubriciones, edad de la primera cubrición, todos estos parámetros en conjunto con un mal manejo de alimentación y un mal estado sanitario van a influir de manera negativa sobre la tasa de fertilidad. En el caso de los machos, entre los factores más importantes son el estado sanitario, la edad, el ser reproductores estacionales, por la aparición de cambios en su fisiología reproductiva; además de la regulación del fotoperiodo, en la cuál los machos incrementan su libido durante los días cortos, concordando con el reinicio de la actividad óvarica de la oveja (Farfán, 2017; Gómez, 2012).

En el caso de utilizar alguna técnica reproductiva es necesario destacar el uso de buenos métodos para evaluar el estado reproductivo que determine un buen estado de los órganos reproductores, en los que sobresalen la evaluación seminal como los métodos de conservación del semen y así evitar alguna falla sobre la tasa de fertilidad al llevar a cabo el uso de alguna biotecnología reproductiva (Gómez, 2012; Pérez *et al.*, 2014).

#### **1.2.2.2 Componentes que intervienen en el desarrollo sexual del ganado ovino**

En los pequeños rumiantes la eficiencia reproductiva se encuentra influenciada por diversos factores que permiten una selección de reproductores, además de las cualidades zootécnicas o ambientales como el peso corporal, el fotoperiodo y la raza, en los machos

la evaluación del estado reproductivo determina el estado óptimo de los órganos reproductores, la capacidad sexual y la buena producción de espermatozoides. Es así, que la capacidad reproductora se va adquiriendo al transcurso de los años con la mayor edad, el peso, diámetro testicular (DT), calidad del semen, entre otras (Farfán, 2017).

Hay evidencias sobre la especie ovina, que tanto la calidad espermática como el comportamiento reproductivo es variable en función al fotoperiodo, la edad y raza del animal (Tabarez *et al.*, 2017). Es así, que la estación reproductiva es un factor de importancia en el libido de los carneros al incrementarse durante los días cortos y que este patrón estacional está ligado a la latitud y condiciones del lugar donde se desarrollen los animales, ya que en latitudes bajas y más cercanas a la línea ecuatorial, la estacionalidad se refleja reducida, aun habiendo razas de ovinos que a lo largo del año no lleguen a presentar cambios en la actividad reproductiva, es por ello que estas variaciones en el carnero refleja alteraciones sobre la disminución de liberaciones de gonadotropinas, rendimiento de las divisiones celulares, DT y calidad espermática (Farfán, 2017).

Ungerfeld (2016) menciona que el patrón estacional se encuentra ligado a la latitud y a las condiciones de la zona en donde se desarrollaron, por lo que en altitudes bajas y que se encuentren cerca de la línea ecuatorial, la estación reproductiva se vuelve inferior, aún cuando existan razas de ovinos que durante todo un año no reflejen cambios en la actividad reproductiva.

### **1.2.3 Formación del espermatozoide**

El espermatozoide de los mamíferos es una célula especializada, que presenta únicos rasgos que otro tipo de célula no los posee y difiere al óvulo (Enciso, 2009). Para que se lleve a cabo la producción de esta célula ocurre un proceso llamado espermatogénesis que se encargara de la producción de espermatozoides en el testículo, específicamente en los túbulos seminíferos, estos contienen una serie muy compleja de celular germinales que estarán en desarrollo para dar lugar a los espermatozoides (Hafez, 2000).

Sin embargo, la etapa final del proceso de espermatogénesis no termina con la diferenciación del espermatozoide por la etapa de espermiogénesis, sino que se continua con la maduración en el epidídimo y finalmente en el tracto reproductor de la hembra con la etapa de capacitación (Enciso, 2009).

### **1.2.3.1 Espermatogénesis**

La espermatogénesis se define como el desarrollo de la célula germinal a espermatozoides, se lleva a cabo dentro de los túbulos seminíferos y la primera aparición de los iniciales espermatozoides en el eyaculado del carnero es variable con la raza, pero se presenta entre las 12 semanas a 20 de edad, aunque existen variaciones en cuanto a la morfología del espermatozoide de las diversas especies, el proceso que se lleva a cabo es similar en todas, pero en el caso del carnero tiene una duración aproximadamente de 47 días su proceso (Enciso, 2009; Rodríguez, 2013).

Es un proceso extenso, por lo que se incluyen tres fases: proliferación, meiótica y espermiación (Cunningham, 2003; Enciso, 2009; Klein, 2014). La fase de proliferación y meiótica en conjunto se les conoce como espermatocitogénesis, en la cuáles durante el proceso de desarrollo embrionario, las células germinales primordiales salen desde la región del saco vitelino del embrión hacia las gónadas no diferenciadas para después dividirse en constantes ocasiones y así formar gonocitos. En el carnero, estos gonocitos experimentan la diferenciación antes de iniciar la pubertad y así formar espermatogonios tipo AO, de los que darán lugar a las otras células germinales. Es así que los espermatogonios tipo A1 se comienzan a dividir para dar lugar los tipos A2, A3 y A4. En el caso de los tipos A4 se divide y dan lugar a los espermatogonios intermedios (tipo In), y se forma el espermatogonio tipo B, pero existen variaciones en la clasificación de los espermatogonios, ya que en algunas especies solo son evidentes tres tipos A y no cuatro. En el caso del tipo A2 no solo tiene el trabajo de formar a las células germinales para que den lugar a los espermatozoides; también tienen la tarea de realizar una división específica para reponer a la población de espermatogonios de tipo A1 (Hafez, 2000).

Los espermatogonios tipo B al dividirse por la fase de mitosis dan lugar a los espermatocitos primarios (Figura 1.1), los que al duplicar su ADN y experimentar cambios nucleares de la profase meiótica, como las etapas de proleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno, por consiguiente, dan lugar a la formación espermatocitos secundarios. Si no hay una síntesis posterior de ADN, los espermatocitos secundarios resultantes se dividen una vez más para dar lugar a las espermátides (Cunningham, 2003; Hafez, 2000; Klein, 2014).

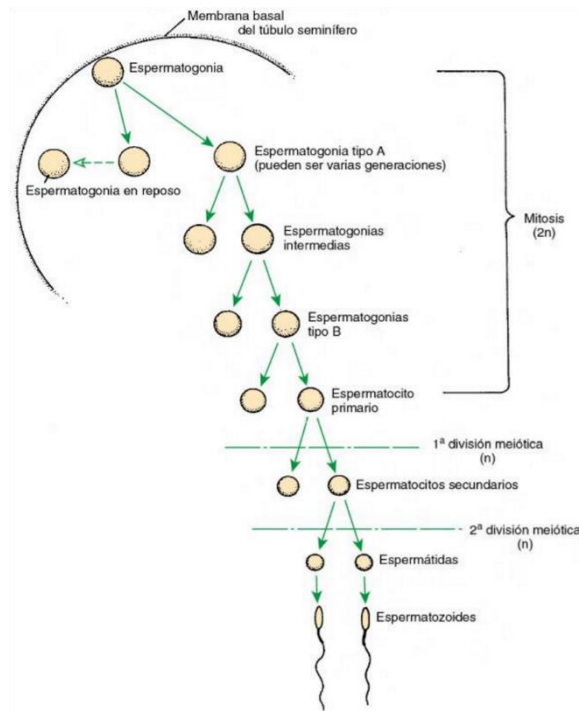


Figura 1.1 Diagrama de la espermatogénesis

### 1.2.3.2 Espermiogénesis

La espermiogénesis comienza con las espermátidas que darán lugar a los espermatozoides por una serie de cambios morfológicos, entre los cuales se incluyen la condensación de la cromatina nuclear, formación de la cola y el desarrollo del casquete acrosómico, por lo que las etapas de transformación de las espermátidas se dividen en cuatro: de Golgi, de encasquetamiento, acrosómica y maduración (Figura 1.2) (Hafez, 2000).



#### **1.2.3.4 Capacitación**

A la etapa final de la maduración espermática se le conoce como capacitación, es llevada a cabo adentro del tracto reproductor de la hembra y se necesita del contacto del espermatozoide con los fluidos que tiene el oviducto, en el transcurso de esta etapa surgen cambios y reorganizaciones de los componentes de la membrana plasmática, así como algunos cambios en el acrosoma que ayudan a que se logre la reacción acrosómica; además de la hiperactividad que adquiere el espermatozoide y permite que se obtenga un movimiento con un fuerte batido del flagelo (Enciso, 2009).

#### **1.2.4 ADN del espermatozoide**

El ADN espermático está formado por una estructura fina, casi cristalina por lo que la organización tan fina que tiene le permite otorgarle la protección al ADN a su paso por el tracto reproductor del macho como de la hembra; así como la protección contra agentes externos estresantes de la oxidación y; además de aquellos aumentos de temperatura que afectan directamente sobre la integridad celular; también le proporciona resistencia sobre la acción de las nucleasas y del estrés mecánico (Contreras, 2018).

##### **1.2.4.1 Diferencias con las células somáticas**

El ADN espermático se encuentra organizado diferente a comparación de las células somáticas (Figura 1.3) y es seis veces más compacto o condensado; además de ocupar 40 veces menos volumen que una célula somática y su gran estabilidad que posee (Ward y Coffey, 1991; Esbert, 2014; Nava y Quintero, 2017).

En las células somáticas su ADN se encuentra compactado por unas proteínas llamadas histonas, formando los nucleosomas, en cambio en el ADN espermático esta misma conformación solo permanece en la fase de espermiogénesis, en donde el núcleo se encuentra de manera haploide, posteriormente sufre un mecanismo de remodelación y compactación, que es el desarme de los nucleosomas y el inicio de la formación de los toroides, que son la principal unidad que compone al ADN espermático (Ward y Coffey, 1991).



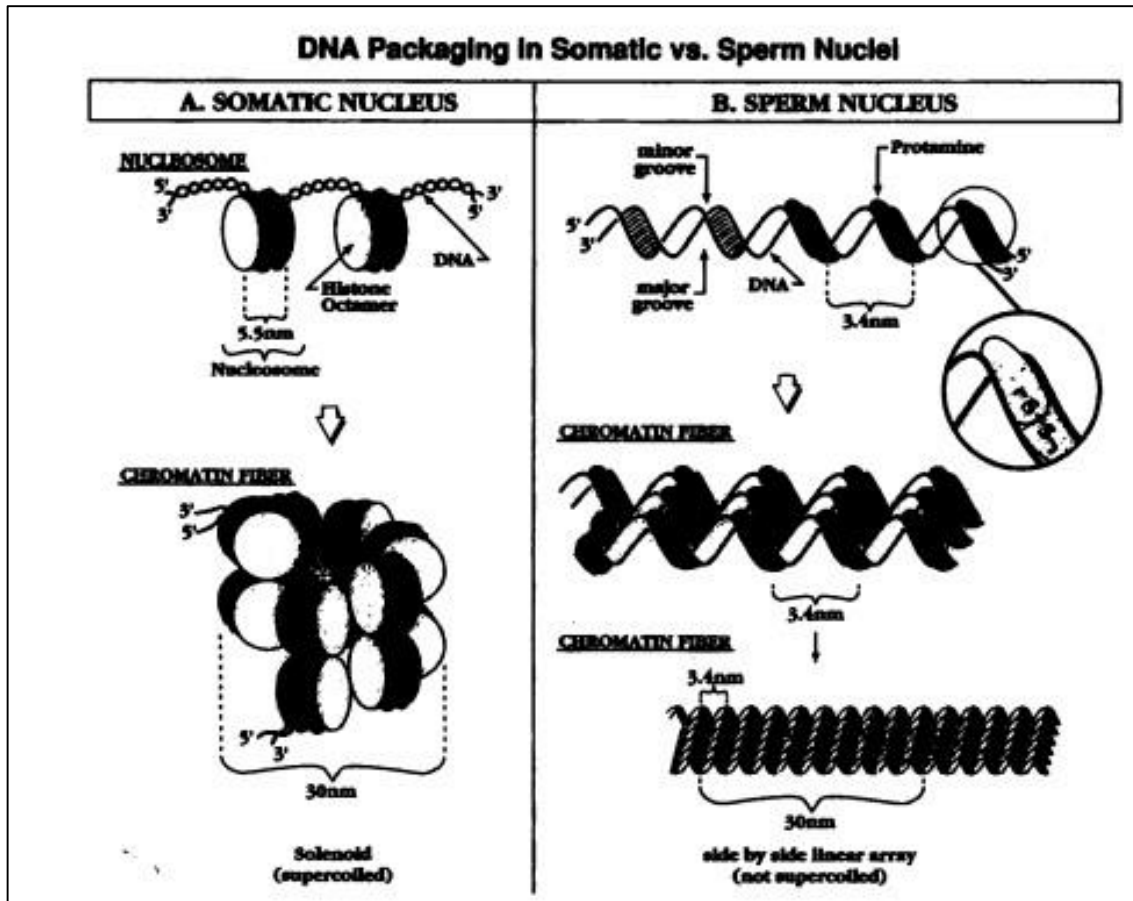


Figura 1.3 Representación esquemática comparativa entre la estructura de la cromatina de la célula somática y la de la célula espermática (Ward y Coffey, 1991).

Durante la espermiogénesis ocurre una remodelación nuclear en la que ocurre el intercambio de las histonas por unas proteínas de transición y por último aparece una segunda remodelación al incorporarse las protaminas, que estas proteínas se ligan al ADN por medio de residuos de arginina (Ward y Coffey, 1991; Esbert, 2014).

El ADN al encontrarse unido a las protaminas se forma un complejo que se organiza y condensa para la formación de toroides, que son estructuras en forma de donas, los cuales presentan un contenido aproximado de 50kb de ADN (Figura 1.4), se encuentra interconectados entre ellos por una región de cromatina que se une a una matriz nuclear filamentosa, enseguida las protaminas se entrecruzan por medio de puentes disulfuros, que fueron originados por la oxidación del grupo sulfhídrico de las cisteínas (Esbert, 2014; Filho *et al.*, 2015).

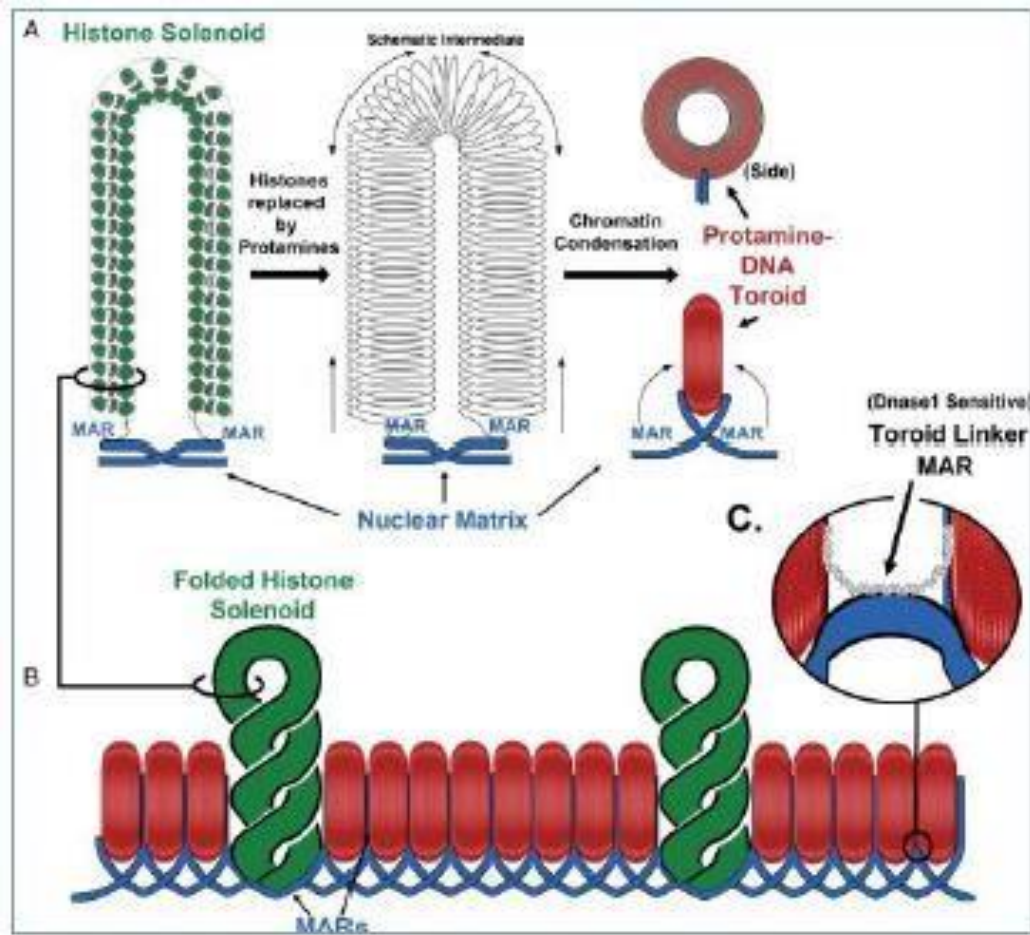


Figura 1.4 Esquema de elementos que componen estructuralmente la cromatina

Todo el proceso sucede cuando el espermatozoide avanza a través del epidídimo y causa una elevada compactación de la cromatina, provocando una disminución de la fragmentación del ADN espermático, por lo que la sustitución de histonas por protaminas pueda darse a nivel epididimario con la reparación del ADN que este fragmentado (Nava y Quintero, 2017).

#### 1.2.4.2 Compactación del ADN espermático

Cuando termina el proceso de la espermatogénesis, la cromatina espermática se encuentra organizada en los nucleosomas, los cuales al estar compuestos por histonas, le permiten un buen superenrollamiento al ADN y una correcta organización (Mendieta, 2019).

En la fase de capuchón durante la espermiogénesis ocurre la condensación nuclear espermática, en donde el ADN espermático se compacta hasta reducirse al 10% del volumen del ADN de una célula somática e inicia la hiperacetilación de las histonas en las espermátidas y persiste durante todo el proceso de intercambio de histonas a protaminas. La interacción de ADN-histona se ve disminuida por la hiperacetilación y las

proteínas de bromodominio (Brdt) reconocen los sitios de hiperacetilación para unirse e inducir la condensación de la cromatina independiente del ATP (trifosfato de adenosina). Es en ese momento cuando ingresan las proteínas de transición y comienzan a intercambiarse con las histonas, en donde dos de ellas inician la condensación nuclear de manera apical a caudal (Mendieta, 2019).

Posteriormente inicia la desestabilización de los nucleosomas para que no ocurra el enrollamiento del ADN y así se unan las proteínas de transición por medio de sus terminaciones de zinc, a las islas CpG, las que son abundantes en citosina y guanina presente en las posiciones genéticas 5`- 3`, por lo que comienza la condensación de la cromatina. Las proteínas de transición proveen la reparación del ADN fragmentado, cuando termina el intercambio, la cromatina se encontrará condensada por nucleosomas que habrán desaparecido, posteriormente estas proteínas de transición son intercambiadas por otras proteínas llamadas protaminas (Figura 1.5) las cuales comienzan una última reorganización para que la cromatina espermática finalmente quede compactada (Olivia, 2006).

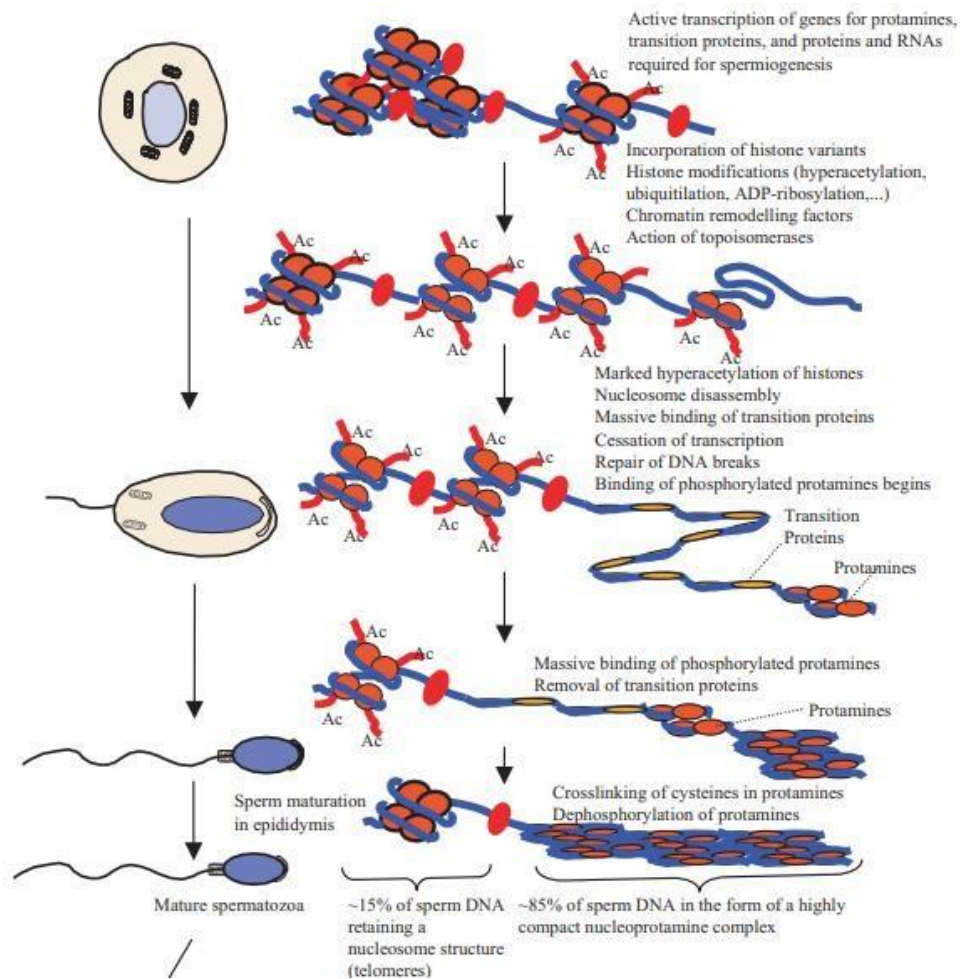


Figura1.5 Esquemización de los cambios que ocurren en la cromatina durante el intercambio de complejo núcleo-histonas a núcleo-protaminas en la fase de espermiogénesis.

#### 1.2.4.2.1 Protaminas

Son proteínas básicas descubiertas hace más de una década, son de bajo peso molecular y se encuentran asociadas al ADN en los núcleos espermáticos maduros; en cuanto a su composición, están integradas de 50-100 aminoácidos, que presentan más de 70% de arginina y cerca del 10% de cisteína. Se han reconocido dos variedades de protaminas en diferentes especies, la protamina 1 (P1) y la protamina (P2), pero solo la P1 se ha encontrado en la mayoría de las especies (Enciso, 2009; Cambiasso *et al.*, 2018; Mendieta, 2019).

#### 1.2.4.2.2 Función de la protamina en la compactación del ADN espermático

La principal función que desempeñan las protaminas es la síntesis y adherencia a la cromatina nuclear espermática, por lo que le permite estabilidad y compactación al núcleo; además de una protección por su recorrido para llegar al ovocito. Estas proteínas

permiten la condensación del ADN que le confiere resistencia ante el estrés mecánico, ya que esta condensación del ADN del espermatozoide es importante para el proceso de fertilización, para penetrar las capas celulares que rodean al ovocito, pero eso no descarta que los espermatozoides pueden sufrir de daño (Enciso, 2009).

Cuando ocurre una uniformidad en la cadena de enlaces fosfodiéster, gracias a la neutralización negativa de las protaminas sobre las cadenas; este proceso pasara cuando la P1 cubre a la doble cadena de ADN, esta interacción envuelve determinado número de pares de bases y provoca que el ADN obtenga una conformación ideal. Posteriormente los residuos que hay de cisteína en las protaminas conducen a la formación de puentes disulfuro en primera instancia para fijar la unión entre la P1 y el ADN, por lo que se estimulan las fibras de ADN vecinas para que se unan e incrementen la compactación. De esta manera, ocurre la formación de los toroides que forman la primera organización condensada de cromatina espermática madura. En el caso de la P2, tendrá acción por medio de los residuos que quedan de cisteína unidos a átomos de zinc, estos últimos tienen una participación en la condensación nuclear y, así permitir darles resguardo a los grupos tiol de las protaminas para evitar la oxidación y formación de puentes disulfuro inter e intra protamina (Mendieta, 2019). Es por ello que al existir niveles elevados de zinc se reduce la conformación de puentes y, por ende, la cromatina presenta una compactación reducida y, por el contrario, cuando existe la deficiencia de zinc, la condensación se torna más densa (Cambiasso *et al.*, 2018).

Cuando los espermatozoides realizan su curso por el epidídimo, una función que desempeñan las protaminas por medio de los puentes disulfuro es bloquear determinados genes de las espermátidas para que exista una reprogramación del macho en el inicio del desarrollo embrionario (Enciso, 2009; Mendieta, 2019).

### **1.2.5 La fragmentación del ADN espermático**

El resultado de los peores parámetros seminales como la concentración, motilidad y la morfología espermática, se encuentran ligados a niveles elevados de daño en el ADN, pero cabe recalcar que hay animales con buenos parámetros seminales, pero con daño en el ADN y presentan parámetros seminales dentro de lo normal; por ese motivo se ha tomado en cuenta la inclusión de este estudio sobre el daño al ADN espermático como un marcador más objetivo sobre las valoraciones que se realizan de manera convencional (Esbert, 2014).

### **1.2.5.1 Etiología de la fragmentación del ADN espermático**

Son distintas las causas que pueden provocar la fractura sobre el ADN espermático, pero Enciso (2009) Contreras (2018) y Santos *et al.*, (2018) mencionan que el origen aún no se conoce con exactitud, pero que se puede dar de manera natural o por medio de la manipulación de preparaciones espermáticas que se realizan en las técnicas de reproducción asistida; además de la nombración de tres posibles orígenes. Como primera causa sería el empaquetamiento anormal de la cromatina durante la fase de espermiogénesis, posteriormente una consecuencia de apoptosis defectuosa antes de la eyaculación y en última instancia una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en el eyaculado. Recalca Santos *et al.* (2018) que los espermatozoides del carnero son más susceptibles a sufrir un daño debido a la alta susceptibilidad a las ROS y a un estrés oxidativo originado por calor.

#### **1.2.5.1.1 Empaquetamiento anormal de la cromatina espermática**

Cuando ocurre la reorganización de histonas por protaminas durante la espermiogénesis, la acción de endonucleasa de la enzima topoisomerasa II es impredecible. Esta enzima se encarga de cortar y acomodar correctamente el ADN en determinadas etapas de la fase de espermiogénesis, por lo que permite la liberación del estrés de torsión y así facilitar la protaminación en conjunto con el empaquetamiento de la cromatina; sin embargo si existiera algún tipo de alteración en el control de este proceso o falla en el proceso de reparación sobre los cortes de ADN, puede ocasionar que el espermatozoide llegue al eyaculado ADN fragmentado, por lo que la presencia de estas roturas en el ADN de los espermatozoides eyaculados se considera como un indicativo de un proceso de maduración incompleto (Enciso, 2009; Esbert, 2014; Contreras, 2018; Santos *et al.*, 2018).

#### **1.2.5.1.2 Apoptosis defectuosa antes de la eyaculación**

Durante la fase de espermatogénesis, en los testículos, las células germinales se expanden clonalmente por medio de divisiones mitóticas antes del inicio de la meiosis y lleguen a la diferenciación para finalizar a espermatozoides maduros. En este proceso, se encuentra una excesiva expansión y esta equilibrada por un mecanismo selectivo de apoptosis, por lo que la cantidad de células se deben acomodar a la capacidad de las células de Sertoli para sustentarlas. Cuando ocurre un fallo en el proceso de apoptosis, dan como resultado espermatozoides morfológicamente anómalos, con funciones bioquímicas irregulares y/o con daño de ADN, al no ser eliminados y encontrarse presentes en el eyaculado, se indica

que ha tenido lugar a un mecanismo apoptótico incompleto (Contreras, 2018; Santos *et al.*, 2018).

#### **1.2.5.1.3 Producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el eyaculado**

La producción de EROs por parte de los espermatozoides debe ser continuamente inactivadas para que se mantengan constantes las funciones normales de la célula, ya que es necesario tener bajos niveles de EROs para la hiperactivación, capacitación espermática y la reacción acrosómica; sin embargo, cuando existe un exceso en su producción pueden originarse cambios en las funciones celulares y llegar a perjudicar la supervivencia celular (Nava y Quintero, 2017; Contreras, 2018).

Es así, que el término “estrés oxidativo” que ocurre en el tracto reproductivo del macho, se define como la producción inestable de EROs y por consiguiente la disminución de la capacidad antioxidante del plasma seminal. Las EROs son radicales libres que producen un daño oxidativo al ser moléculas altamente reactivas de vida corta, estructuralmente presentan un electrón no apareado girando en sus orbitas externas, lo que las hace inestables y así provocan una oxidación a toda molécula vecina, es por ello que deben establecer algún vínculo con otro electrón para convertirse en estables, alterando su estructura y volviéndose en otro radical libre. Entre las EROs de mayor interés se encuentran el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), radical peróxido ( $ROO^\cdot$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), el cuál es el producto final de la reactividad de las EROs y es considerado el más tóxico de los oxidantes (Enciso, 2009; Nava y Quintero, 2017; Contreras, 2018)

El contenido de Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGP) que contienen los espermatozoides en su membrana plasmática los convierte susceptibles, en el proceso de criopreservación se reducen los AGP por la peroxidación lipídica a consecuencia del ataque de EROs hacia los espermatozoides, pero la mayor producción de EROs ocurre por la contaminación de los leucocitos y/o macrófagos provenientes de espermatozoides anormales o moribundos; además de la abundancia de residuos citoplasmáticos causantes de efectos perjudiciales sobre las membranas espermáticas, reducción de la movilidad, pérdida de viabilidad y alteraciones sobre la membrana plasmática provocando daño al ADN, dando lugar a un bajo potencial de fertilidad (Enciso, 2009; Contreras, 2018).

En un trabajo realizado por Gürler *et al.* (2016) encontraron que el efecto que provocan las EROs sobre el ADN espermático es debido a un daño previo, como el provocado al someter a los espermatozoides a la criopreservación, ya que los resultados que obtuvieron indicaron que el daño al ADN espermático fue significativo cuando aumentaron los niveles de producción de EROs (particularmente los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en muestras de semen descongelado, en cambio en muestras de semen fresco presentaron menor daño sobre el ADN, no hubieron variaciones posterior a las 24 horas de incubación, a pesar de que los niveles de EROs aumentaron significativamente en el mismo periodo.

#### **1.2.5.1.4 Otros factores**

Existen otros factores que pueden alterar el ADN de los espermatozoides, como la centrifugación, el cuál es un proceso que también afecta la viabilidad espermática, al tener un elevado incremento en el tiempo de centrifugación o en la fuerza gravitacional, provoca un aumento significativo sobre la fragmentación del ADN espermático; es por ello que se han puesto en marcha diversos sistemas de centrifugación que puedan minimizar el efecto perjudicial hacia los espermatozoides. En cambio, la incubación del semen a temperaturas ambientales o a 37°C de igual forma puede causar daño. Es por ello que el procesamiento de muestras seminales aplicadas a las tecnologías de reproducción asistida debe evitar la incubación prolongada de semen, las suspensiones de espermatozoides y el uso de métodos de criopreservación que provoquen en menor medida la fragmentación del ADN espermático (Enciso, 2009; Contreras, 2018; Santos *et al.*, 2018).

Gürler *et al.* (2016) menciona que la criopreservación afecta negativamente diversas estructuras de las células espermáticas, como la integridad de la cromatina espermática, además de incrementar la susceptibilidad de esta durante la incubación a 37°C. En el caso de Khalifa *et al.* (2008) mencionan que la criopreservación produce una inestabilidad de la cromatina, generando una fragmentación y sobrecondensación del ADN espermático, sin embargo, Martin *et al.* (2004) reportaron en un trabajo que no hay efecto de la criopreservación sobre la integridad del ADN.

Nur *et al.* (2011), reportaron en un trabajo realizado sobre la especie ovina que el proceso de criopreservación no causa efecto sobre la integridad de la cromatina, indiferentemente de que el semen se haya congelado de manera rápida (0,5°C/min) o de forma lenta (5°C/min); anteriormente Nur *et al.* (2010), habian reportaron que el incremento del



porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN se debía al método de criopreservación implementado, pero indistintamente del crioprotector utilizado.

### **1.2.6 Evaluación de la fragmentación del ADN espermático**

En varios estudios se han tenido resultados óptimos sobre parámetros seminales que se encuentran dentro de los rangos; sin embargo esos mismo machos evaluados han presentado problemas para dejar preñadas a la hembras; además de pérdidas gestacionales tempranas o muertes embrionarias, por lo que ha sido en los últimos años de importancia el tomar como indicativo de importancia la evaluación de la fragmentación del ADN espermático en los animales, además del poco enfoque que se le da a las especies de producción como bovinos, porcinos, ovinos y caprinos. Actualmente se cuentan con varias técnicas que permiten evaluar el daño al ADN espermático y que aún no se han incluido en laboratorios de andrología en su totalidad, pero se deberían de tomar en cuenta ya que permiten asegurar en conjunto con la evaluación seminal convencional la tasa de fertilidad (Saleh *et al.*, 2003; Acharyya *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2015).

#### **1.2.6.1 Técnicas de análisis para la fragmentación del ADN espermático**

Existen varias técnicas que permiten la evaluación del ADN espermático y son de gran importancia al momento de determinar en sistemas de producción el impacto de muestras seminales de sementales de alto valor genético utilizadas en las diferentes técnicas de reproducción asistida; además permiten ampliar un panorama de información para desarrollar estrategias y recomendación de manejo que permitan mejorar la producción con el aumento de los índices reproductivos, asegurando tanto la sustentabilidad, calidad e inocuidad (Álvarez *et al.*, 2015).

En las últimas décadas, se han desarrollado varias técnicas de evaluación seminal, que se basan en métodos fluorescentes, que ayudan a tener una valoración más precisa sobre la integridad de varios componentes celulares como las mitocondrias, el ADN nuclear, la membrana plasmática y el acrosoma; además de permitir evaluar otros aspectos sobre la capacidad funcional de las células espermáticas. Es así, que las técnicas de evaluación han permitido reconocer de manera más precisa, las alteraciones celulares ocasionadas por procedimientos como los métodos de centrifugación llevadas a cabo en diversas técnicas de reproducción asistida (Humana, 2007; Enciso, 2009; Álvarez *et al.*, 2015; Contreras, 2018).

Para llevar a cabo estos métodos de evaluación del ADN espermático se requieren de materiales laboriosos, por el uso de instrumental costoso o la utilización de enzimas, las que por su actividad y accesibilidad a las roturas se requiere por la alta condensación que presenta la cromatina espermática. Los diversos métodos se dividen en directos, los cuáles evalúan el “daño real” del ADN y se incluyen técnicas como la TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferasa) y el Ensayo Cometa; en cambio se encuentran aquellas que evalúan de manera indirecta el “daño potencial” del ADN, como son: la Prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD), el Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática (SCSA), la tinción de Naranja de Acridina (NA), entre otros; sin embargo, se han utilizado otras pruebas para determinar el grado de condensación o la integridad de la cromatina espermática mediante tinciones sencillas como el Azul de Anilina (AA), Azul de Toluidina (AT) y Cromomicina A3 (CMA3) (Contreras, 2018).

#### 1.2.6.1.1 Test de Azul de Toluidina (AT)

Es una prueba que se encarga de evaluar el grado de condensación de la cromatina espermática, permite detectar el daño potencial y susceptibilidad a la desnaturalización. Es una técnica muy utilizada para estudios espermáticos, ya que durante la maduración de los espermatozoides el ADN se condensa más de lo normal, gracias a las protaminas; sin embargo, los espermatozoides con cromatina inmadura tienden a tener más roturas de ADN (Nava *et al.*, 2016; Contreras, 2018; Mendieta, 2019).

Es un colorante catiónico cuya unión al ADN da lugar a un color metacromático violeta oscuro que corresponden a agregados de AT interactuando iónicamente con los grupos fosfatos del ADN, en el caso de la coloración violeta claro es debido a la participación de un número mucho más reducido de moléculas de AT que se unen como monómeros al ADN mediante intercalación o por unión iónica, mientras que la neutralización completa de los grupos fosfato por las argininas de las protaminas y el entrecruzamientos entre protaminas son los principales factores responsables de la reducida afinidad de la cromatina espermática por los colorantes catiónicos, tornándose azul pálido (Álvarez *et al.*, 2015; Contreras, 2018).

La tinción con azul de toluidina permite evaluar los efectos sobre el grado de condensación-descondensación de la cromatina del ADN espermático, al detectar la ausencia o ruptura de puentes disulfuro. La reducción de los grupos disulfuro mediante agentes reductores, permite que las proteínas se relajen y que los grupos fosfato del ADN queden disponibles y accesibles a la unión de los colorantes. Esta técnica tiene como

ventaja su bajo costo y fácil elaboración, pero la principal desventaja es su baja reproducibilidad y difícil observación por las coloraciones intermedias que se presentan. El colorante AT se ha utilizado para detectar y evaluar la condensación de la cromatina en especies de producción tradicional, como el caballo (*Equus caballus*), la vaca (*Bos taurus*), además de las especies de producción no tradicional, como la llama (*Lama glama*), guanaco y la alpaca (*Vicugna pacos*) (Contreras, 2018; Mendieta, 2019).

#### 1.2.6.1.2 Test de Azul de Anilina (AA)

El azul de anilina método de coloración de tipo básico que reacciona con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), los grupos sulfatos de los glucosaminoglucanos y los grupos carboxilos de las proteínas. Esta tinción discrimina entre las histonas ricas en lisina y las protaminas ricas en arginina y cisteína, teniendo afinidad por las histonas, ya que permite detectar la persistencia de las mismas en el ADN de los espermatozoides, por lo que detecta defectos en la compactación o inmadurez cromatínica (Álvarez *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2015).

El uso de esta técnica es simple, económica y solo requiere de un microscopio óptico. Los espermatozoides que no se tiñen son los que presentan cantidades bajas de histonas, por lo que los teñidos parcial o totalmente son los que presentan una deficiencia en el proceso de protaminación (Alves *et al.*, 2015). Se encuentran pocos trabajos sobre el uso de esta técnica en animales, pero Mukhopadhyay *et al.* (2011) en un trabajo realizado sobre muestras seminales de bovinos y búfalos que presentaban baja y alta calidad, al someterlas a la técnica de AA presentaron una persistencia de histonas, pero menor al 10%; sin embargo, en un trabajo realizado por Oliveira *et al.* (2013) encontraron que la técnica AA mostró una alta correlación negativa ( $r=-0,90$ ) con la fertilidad en toros. Por ello, al ser una prueba rápida y de bajo costo, la AA tiene un gran potencial para convertirse en un procedimiento rutinario sobre la evaluación de defectos de cromatina.

Peris-Frau *et al.* (2020) en un estudio realizado sobre la capacitación *in vitro* en muestras seminales de carneros sometidas a la criopreservación con diferentes tiempos de capacitación, encontraron que aumentaba significativamente la descondensación de la cromatina ( $P<.05$ ), por lo que se obtuvieron mayores porcentajes de fragmentación de ADN espermático al utilizar la técnica de AA, en un periodo de 180 a 240 minutos en muestras frescas y la disminución de la condensación de cromatina en muestras criopreservadas se dio en un lapso de 5 a 30 minutos, por lo que el uso de esta técnica permite detectar la estructura de la cromatina durante eventos fisiológicos.

#### 1.2.6.1.3 Test de Naranja de Acridina (NA)

Es una técnica que permite evaluar la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización. El NA es un fluorocromo metacromático que puede utilizarse en tinción nativa o desnaturalizada, se basa en someter a la célula a un agente desnaturalizante y posteriormente realizar la tinción. El espectro de emisión del fluorocromo (verde o naranja) depende del estado de la hebra de ADN. Si el colorante se intercala con la doble hélice intacta del ADN nativo le permitira emite una fluorescencia verde, pero si el ADN se encuentra desnaturalizado, la unión del fluorocromo con la cadena sencilla dañada va a generar una fluorescencia de color naranja (Ortega López *et al.*, 2010; Czubaszek *et al.*, 2020).

En algunos casos, se usa la tinción conjunta con bromuro de etidio o yoduro de propidio para analizar viabilidad celular para discriminar entre células apoptóticas, viables y necróticas según la coloración adquirida y la morfología observada. A pesar de ser una técnica de baja reproducibilidad, su aplicación genera la destrucción eventual del ADN que conlleva a tener variación en cuanto a los resultados a medida que pasa el tiempo, y una difícil valoración de las tonalidades intermedias (Álvarez *et al.*, 2015). Por otro lado, también Evenson (2016) menciona que no se han encontrado datos que indiquen una buena repetibilidad entre portaobjetos, tiempo de incubación y observadores, por lo que mencionan que no es creíble al dar indicaciones de que las muestras utilizadas pueden llegar a ser excelentes o muy malas, en así, que cualquier punto intermedio es en gran medida poco fiable y no debe utilizarse para valoraciones de infertilidad. Además de no ser un ensayo económico, por la utilización de equipo costoso, como el uso de microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo, pero aún así es un método relativamente rápido. En la actualidad, se ha utilizado en producción animal para determinar la vitalidad de los espermatozoides, a pesar de aporta limitada información (Ortega López *et al.*, 2010); sin embargo, Ajina *et al.* (2016) en un trabajo realizado en humanos mencionan que la prueba de NA puede considerarse como herramienta importante para llevar a cabo la evaluación de la integridad del ADN espermático en hombres infértiles.

Andraszek *et al.* (2014) en un trabajo realizado en bovinos, encontraron en frotis analizados por la técnica de NA la presencia de solo fluorescencia verde, por lo que indico que el material genético de los espermatozoides producidos por los toros se encontraba intacto a comparación de la utilización de otras técnicas como AA y CMA3, en las que si

encontraron porcentajes de espermatozoides con niveles elevados de histonas (1,40%) para el caso de AA y para CMA3 se encontraron leves desviaciones en el número de espermatozoides con cromatina normalmente empaquetada (1,35%).

#### 1.2.6.1.4 Test de cromomicina A3 (CMA3)

La cromomicina es un fluorocromo usado para teñir el ADN, ya que sirve para la confección de cariotipos al formar un patrón de bandas R en los cromosomas, permite diferenciar al ADN unido a histonas del ADN unido a protaminas. La CMA3 se acopla a regiones ricas en guanina-citosina del ADN y compite con las protaminas por los mismos sitios. Por ello, a mayor protaminación del ADN, menor unión del fluorocromo y por consiguiente menor intensidad de la fluorescencia verde. Por lo tanto, la técnica identifica a los espermatozoides que presentan persistencia de histonas en su ADN (Álvarez *et al.*, 2015; Evenson, 2016; Hamilton *et al.*, 2018).

Es una técnica que requirió del uso de un microscopio de fluorescencia por un largo periodo (Franken *et al.*, 1999). Es así, que, a la elevada importancia sobre esta técnica y su aplicación constante, se ha recomendado el uso de citometría de flujo para mejorar su precisión, con lo que posteriormente se mejoró al utilizar una combinación con yoduro de propidio para facilitar la exclusión de cuerpos apoptóticos (Fathi *et al.*, 2011).

Es muy escasa la utilización de esta técnica en células espermáticas de animales domésticos, pero Simões *et al.*, (2009) quienes fueron los primero en utilizar la técnica CMA3 para evaluar la deficiencia de protaminación en espermatozoides bovinos, mencionaron que el estrés no parece ser suficiente para alterar ese proceso, además que la raza Nelore utilizada es resistente a climas trópicos y no sufre estrés por calor, además de mencionar la infertilidad de los bovinos consideran que no se encuentre ligada directamente a la protamina deficiente.

Rahimizadeh *et al.* (2020) realizaron un trabajo al evaluar el efecto de diluyente a base de tris-lecitina de soja (TSL) suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) sobre muestras espermáticas de carneros tomadas del epidídimo y refrigerados en diferentes tiempos (0, 24, 72 y 120 horas), pero al evaluar con la técnica de CMA3 no encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0,005$ ) para la protaminación nuclear entre los grupos experimentales que utilizaron.

Hamilton *et al.* (2018) en un estudio que realizaron en un grupo de carneros sometidos a estrés por calor y uno control, tomaron muestras seminales que analizaron mediante la

prueba de CMA3 mediante citómetro de flujo encontraron mayores porcentajes de espermatozoides con fragmentación del ADN y aumento del número de copias de ARNm de la proteína de transición 1 en el grupo sometido estrés por calor, sin embargo, no se encontraron deficiencias de protaminación en ambos grupos.

#### 1.2.6.1.5 Test SCD (Sperm Chromatin Dispersion)

La realización y descripción de la prueba SCD fue hecha por primera vez en espermatozoides de humanos (Fernandez *et al.*, 2003). Esta técnica nos permite diferenciar entre los espermatozoides cuya cromatina está condensada e intacta de los que tienen su ADN fragmentado, para ello se basa en tres principios generales: la incrustación de espermatozoides en una matriz de agarosa estándar inerte, incubación en soluciones de lisis específicas para cada especie y una tinción para su visualización (Fernandez *et al.*, 2018).

La eliminación de las proteínas por medio de la incubación en soluciones lisis da como resultado la propagación de bucles de ADN en la matriz de agarosa circundante, estos núcleos desproteinizados se conocen como nucleoides, por lo que los bucles dispersos constituyen un halo periférico de cromatina de ADN que surge de un núcleo central, aquellos nucleoides de los espermatozoides que no presentan fragmentación de ADN aparecerán con grandes halos de dispersión. Por el contrario, cuando la lisis se realiza en nucleoides espermáticos con ADN fragmentado, serán susceptibles a la desnaturalización, por lo que la dispersión del ADN en el microgel de agarosa se presentará de manera limitada o nula la aparición del mismo. Esto puede estar relacionado con la estructura característica de la cromatina espermática de cada especie (Fernandez *et al.*, 2018; Hamilton y Assumpção, 2019).

Fernandez *et al.* (2003) en su investigación observó cuatro patrones de dispersión cuando los espermatozoides se sometieron a la prueba SCD tanto por microscopía de fluorescencia como de campo claro: 1) núcleos con grandes halos de dispersión de ADN; 2) núcleos con halos de tamaño mediano; 3) núcleos con halos de muy reducido tamaño; y 4) núcleos con ausencia de halo. Sin embargo, Fernandez *et al.* (2007) en otra investigación tomo en cuenta una quinta clasificación, en la que se consideraron a los espermatozoides que se encontraban con una tinción más débil o irregular, esta clasificación permiten identificar y diferenciar a aquellos espermatozoides con diferentes niveles de fragmentación de manera que el evaluador pueda visualizar por medio de una observación subjetiva.

En la actualidad la técnica se encuentra de manera comercializada en forma de kit específico para cada especie y los resultados se pueden interpretar mediante microscopio de campo claro o por medio de microscopía de fluorescencia, valorando el tamaño del halo de dispersión de la cromatina que presenten los espermatozoide; además la principal ventaja que presenta la técnica es la facilidad en su ejecución, no se requiere de un equipo complejo y tampoco de personal especializado para la interpretación de resultados (Arbaiza, 2020).

Peris-Frau *et al.* (2019) realizaron una comparación entre el Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática (SCSA) y el kit de Halomax-Ovis en muestras espermáticas ovinas congeladas-descongeladas incubadas en condiciones de capacitación en líquido oviductal sintético suplementado con suero ovino en estro en diferentes tiempos (0-240 minutos), para detectar en índice de fragmentación del ADN; por lo que en el SCSA no obtuvieron resultados significativos sobre la incubación, mientras que en el kit de Halomax-Ovis se obtuvieron índices de fragmentación altos a los 180 minutos de incubación, en así, que no encontraron correlación entre ambas pruebas por lo que se pueden cuantificar diferentes tipos de daño en el ADN en espermatozoides de carneros bajo las condiciones mencionadas.

Por otro lado, Huanca *et al.* (2020) en un trabajo en donde evaluaron tres métodos de colecta de semen de alpaca, se analizó el índice de fragmentación del ADN espermático por medio de la técnica SCD, en la cuál encontraron de  $36.44 \pm 22.50\%$  en espermatozoides recuperados de la desviación de los conductos deferentes, de  $13.65 \pm 18.98\%$  se encontraron por medio de la colecta por electroeyaculador y  $8.42 \pm 10.28\%$  para espermatozoides colectados mediante poscópula, por lo que consideraron a la técnica SCD óptima para el estudio sobre la fragmentación del ADN espermático para detectar que método de colecta afecta la calidad seminal en alpacas.

### 1.3 Hipótesis

Las técnicas de tinción de fragmentación del ADN espermático como la Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) y Cromomicina (CMA3) son 20% más susceptibles en detectar daños en el ADN espermático en ovinos de pelo, con respecto a las tinciones convencionales de Naranja de Acridina (NA), Azul de Toluidina (AT) y Azul de Anilina (AA).



## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar diferentes técnicas de fragmentación del ADN espermático en muestras descongeladas de semen de ovinos de pelo.

### 1.4.2 Objetivos específicos

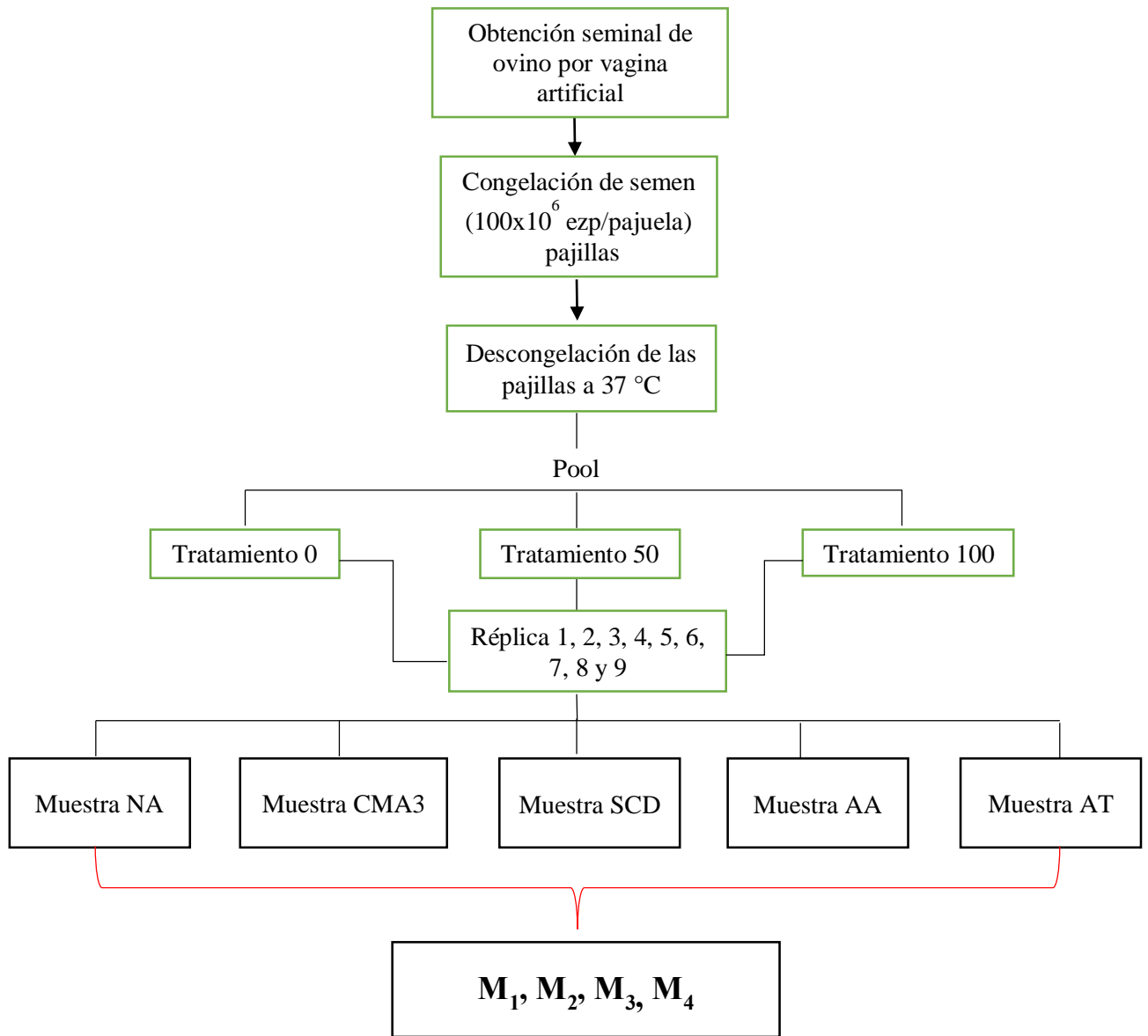
- Estandarización de las técnicas de Naranja de Acridina (NA), Dispersión de la cromatina espermática (SCD), Cromomicina A3 (CMA3), Azul de Toluidina (AT) y Azul de Anilina (AA).
- Evaluar la fragmentación del ADN espermático mediante la técnica de NA, SCD, CMA3, AT y AA.

## 1.5 Procedimiento metodológico

### **1.5.1 Localización del área del trabajo**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular del Instituto Tecnológico de Conkal, en el municipio de Conkal; Yucatán. Asimismo, en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el campo experimental de Mocochoá en el kilómetro 25 de la antigua carretera Mérida-Motul, localizados a 21° 06' 18" latitud norte y 89° 27' 12" longitud oeste, con un clima tropical subhúmedo (Awo) y una temperatura media anual de 26,5°C, con una precipitación total de 900 mm y 9 msnm (INIFAP, 2018).

### 1.5.2 Diagrama del procedimiento experimental



M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>: no. de machos

## **Comparación de técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático en ovino de pelo.**

Soza-Mata, M. F.<sup>1</sup>, Ramón-Ugalde, J. P.<sup>1</sup>, Zamora-Bustillos, R.<sup>1</sup>, Loeza-Concha, H.<sup>3</sup>, Castellanos-Zacarías, C.<sup>1</sup>, Pinzón-López, L. L.<sup>1</sup>, Domínguez-Rebolledo, A. E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>TecNM, Campus Conkal. Antigua carretera Mérida-Motul km 16.3, Conkal, C. P. 97345, Yucatán, México.

<sup>2</sup>INIFAP, Campo Experimental Mocochoá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mocochoá, Yucatán.

<sup>3</sup>COLPOS, Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná. km 17.5, C.P. 24450; Sihochac, Champotón, Campeche.

En los últimos años se ha reconocido al estudio de la integridad del ADN (IADN) del espermatozoide como un parámetro importante de la calidad seminal y de la fecundidad. Sin embargo, algunas de las técnicas que se utilizan actualmente para medir el daño del ADN espermático presentan una baja reproductibilidad en los resultados y entre especies. El objetivo de este trabajo fue evaluar 5 técnicas de fragmentación del ADN en muestras espermáticas descongeladas de ovinos de pelo sometidas a fragmentación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se descongelaron 36 pajuelas de 4 sementales de la raza Blackbelly, se mezclaron (pool), se diluyeron en PBS a una concentración de ~30x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL y se dividieron en tres tratamientos: T0: muestra sin oxidante (considerada como 0% de ADN dañados), T100: muestra incubada con 300µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 horas (inducción de fragmentación de ADN (100%). Posteriormente, la mitad de del T0 y T100 se mezclaron para obtener una proporción del 50% de espermatozoides con ADN fragmentado (T50). Las muestras se analizaron con las diferentes técnicas: Azul de Anilina (AA), Azul de Toluidina (AT), Naranja de Acridina (NA), Cromomicina A3 (CMA3) y Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD). En todas las técnicas, las regresiones lineales presentaron un nivel de significancia menor al 5%, así como una correlación significativa (r=0.962, P<0.01). Sin embargo, entre tratamientos se observó que la técnica NA (34.82 ± 3.00%) en el T50 y la técnica de AA (89.55 ± 1.45%) en el T100, fueron las que menor sensibilidad presentaron para detectar daños en el ADN en comparación con las otras técnicas. En conclusión, las técnicas que mejor evalúan la IADN del espermatozoide en ovino de pelo son la CMA3, SCD y AT; sin embargo, la técnica de AT presenta un menor tiempo de elaboración y un mayor tiempo de almacenamiento de las muestras, además de ser más económica al no requerir tinciones de fluorescencia, ni equipo sofisticado para su análisis.

*Palabras clave:* ADN; Fragmentación; Técnicas; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Ovino

*Contacto:* Domínguez-Rebolledo, A. E. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochoá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mocochoá, Yucatán. Tel: 8000882222 Ext.88215. E-mail: [dominguez.alvaro@inifap.gob.mx](mailto:dominguez.alvaro@inifap.gob.mx)

## 2.2 Abstract

In recent years, the study of sperm DNA integrity (IADN) has been recognized as an important parameter of seminal quality and fertility. However, some of the techniques currently used to measure sperm DNA damage have low reproducibility in results and between species. The objective of this work was to evaluate 5 DNA fragmentation techniques in thawed sperm samples from hair sheep subjected to fragmentation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thirty-six straws from 4 Blackbelly stallions were thawed, mixed (pool), diluted in PBS to a concentration of  $\sim 30 \times 10^6$  spermatozoa/mL and divided into three treatments: T0: sample without oxidant (considered as 0% DNA damaged), T100: sample incubated with 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hours (induction of DNA fragmentation (100%). Subsequently, half of T0 and T100 were mixed to obtain a 50% proportion of spermatozoa with fragmented DNA (T50). The samples were analyzed with the different techniques: Aniline Blue (AB), Toluidine Blue (TB), Orange Acridine (OA), Chromomycin A3 (CMA3) and Sperm Chromatin Dispersion (SCD) techniques, the linear regressions presented a significance level of less than 5%, as well as a significant correlation ( $r=0.962$ ,  $P<0.01$ ). However, between treatments it was observed that the OA technique ( $34.82 \pm 3.00\%$ ) in T50 and the AB technique ( $89.55 \pm 1.45\%$ ) at T100, they showed lower sensitivity to detect DNA damage compared to the other techniques. In conclusion, the techniques that best evaluate the IADN of spermatozoa in hair sheep are CMA3, SCD and TB; however, the TB technique has a shorter processing time and longer sample storage time, as well as being more economical as it does not require fluorescence staining or sophisticated equipment for its analysis.

Keywords: DNA, Fragmentation, Techniques, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sheep

**Correo de tesista:** MM20800273@conkal.tecnm.mx

**Correo del director de tesis:** julio.ru@conkal.tecnm.mx

**Revista de aceptación de artículo:** Ecosistemas y Recursos Agropecuarios

**Lista de autores:**

- Soza Mata María Fernanda (Primer autor, correo: MM20800273@conkal.tecnm.mx )
- Ramón Ugalde Julio Porfirio
- Zamora Bustillos Roberto
- Loeza Concha Henry
- Castellanos Zacarías Carlos
- Pinzón López Luis Leonardo
- Domínguez Rebolledo Álvaro Efrén (Autor de correspondencia, correo: dominguez.alvaro@inifap.gob.mx)