



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**EFFECTO DEL TIEMPO *POSTMORTEM* SOBRE LA
INTEGRIDAD DEL ADN DEL ESPERMATOZOIDE DE COLA DE
EPIDÍDIMO EN OVINOS**

T E S I S

(IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS)

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

M.V.Z. CLAUDIA COLOMBO JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. ALEJANDRO ÁVALOS RODRÍGUEZ

ASESORES:
DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE
DR. FERNANDO BORDERAS TORDESILLAS

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2011

La Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón de Posgrados de Excelencia (PNP) del CONACYT.

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo con el apoyo de una beca de grado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

*A mis hijas y esposo
Por su paciencia ante mi falta de tiempo para Ustedes.*

*A mis padres
Por su amor y apoyo incondicional.*

"Recordar es la única manera de detener el tiempo"

*A la memoria de mis abuelos
Porque por ellos soy.*

*A mis hermanos
Por que cuando lo necesito cuento con Ustedes.*

*A Iliana
Por tu amistad, confianza y paciencia por mi mal carácter.*

A mis asesores Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez, Dra. Marcela Vergara Onofre y Dr. Fernando Borderas Tordesillas por su apoyo y aliento ante mi desesperación por terminar esta tesis.

A la Dra. Ana María Rosales Torres por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio.

A la Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana por sus acertadas recomendaciones para esta tesis.

Al Dr. Luis Arturo García Hernández por su confianza y apoyo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción: Diana, Cyndi, Carmen, Johnny, Jorge, Julio, Ricardo Chávez, Ricardo Macías, Ángel, por los buenos momentos que vivimos durante tantas horas de trabajo.

Finalmente, a todos mis amigos: gracias por su aliento.

*Muere lentamente quien no viaja,
quien no lee, quien no escucha música,
quien no halla encanto en si mismo.*

*Muere lentamente quien destruye su amor propio,
quien no se deja ayudar.*

*Muere lentamente quien se transforma en esclavo del hábito,
repitiendo todos los días los mismos senderos,
quien no cambia de rutina,
no se arriesga a vestir un nuevo color
o no conversa con desconocidos.*

*Muere lentamente quien evita una pasión
y su remolino de emociones,
aquellas que rescatan el brillo en los ojos
y los corazones decaídos.*

*Muere lentamente quien no cambia de vida cuando está
insatisfecho con su trabajo o su amor,
quien no arriesga lo seguro por lo incierto
para ir detrás de un sueño,
quien no se permite al menos una vez en la vida huir de los
consejos sensatos...*

Pablo Neruda

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Partes del espermatozoide	16
2	Asas de los túbulos seminíferos, la red testicular y el conducto epididimario	17
3	Molécula de ADN	23
4	Estructura del nucleosoma	25
5	Condensación del ADN	26
6	Intercambio de histonas por protaminas en el espermatozoide	29
7	Posibles mecanismos en que el estrés oxidativo en el espermatozoide puede generar trastornos en la descendencia	37
8	Sitios celulares y bioquímicos de daño en la hipoxia celular	41
9	Consecuencias funcionales y morfológicas de la disminución intracelular de ATP durante la hipoxia celular	43
10	Fuentes y consecuencias del aumento de calcio citosólico en la hipoxia celular	45
11	Versiones neutra y alcalina del ensayo cometa	48
12	Imágenes de cometas obtenidos de espermatozoides	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pag.
1	Composición de fluidos que entran y salen del epididimo humano	19
2	Proteínas humanas epididimales relacionadas con la maduración	20
3	Proteínas humanas epididimales relacionadas con el almacenaje	21
4	Tipos de estudios de la cromatina	51
5	Categorización de la movilidad masal	58
6	Categorización de la movilidad progresiva	59

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica		Pag.
1	Viabilidad espermática a las 4, 24, 48, 72, 96 y 120 h <i>postmortem</i>	62
2	Concentración espermática a diferentes tiempos <i>postmortem</i>	62
3	Movilidad masal a las 4, 24, 48, 72, 96 y 120 h <i>postmortem</i>	63
4	Movilidad progresiva a las 4, 24, 48, 72, 96 y 120 h <i>postmortem</i>	64
5	Anormalidades totales encontradas a diferentes tiempos <i>postmortem</i> en espermatozoides de cola de epidídimo de ovino	64
6	Porcentaje de ADN en la cola del cometa a diferentes tiempos <i>postmortem</i> en espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo	65

I. RESUMEN

En los mamíferos, el núcleo del espermatozoide completamente maduro es muy resistente a tratamiento químico y a estrés físico, debido a las uniones cruzadas por puentes disulfuro de las protaminas nucleares (Kaneko *et al.*, 2003). Sin embargo, la estabilidad del ADN puede verse afectada por diferentes factores internos o externos, pudiendo producirse o no, daños irreversibles en el ADN, es decir, dependerá de si el tipo de lesión es letal o subletal (Kurtz, 2007). Uno de estos factores que producen daño en el ADN es la autólisis celular, proceso que inicia con la hipoxia celular y la consecuente depleción de ATP una vez que el animal muere. Diversos estudios indican que los espermatozoides con ADN defectuoso pueden tener una morfología, movilidad y capacidad de fecundación normales, pero no dar gestaciones viables, por lo que el porcentaje de fragmentación del ADN podría considerarse un factor que afecta la reproducción en los mamíferos (Evenson *et al.*, 2002), especialmente cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida, una de estas técnicas es la obtención de espermatozoides viables a partir de animales muertos, ya que pueden recuperarse espermatozoides de la cola del epidídimo hasta varias horas e inclusive días después de la muerte. Por lo que, el objetivo de este estudio fue evaluar el porcentaje del daño en el ADN de espermatozoides de ovino, recuperados del epidídimo, en diferentes tiempos *postmortem*, mediante el Ensayo Cometa (EC, técnica con gran sensibilidad que mide niveles bajos de fragmentación del ADN) y establecer la asociación de este parámetro con los que constituyen el espermograma habitual. Para esto, se obtuvieron 60 pares de testículos del rastro, transportándose en refrigeración (4°C), se hizo un análisis morfométrico a cada uno de los testículos (peso, largo, ancho y peso del epidídimo) posteriormente se

obtuvieron espermatozoides por medio de lavado retrógrado epididimal a diferentes tiempos *postmortem* (4, 24, 48, 72, 96 y 120 h), inmediatamente se realizó el espermograma y el EC. Los datos se analizaron por medio de software analizador de imágenes (Comet Score de TriTek-Corp.), se observó una relación entre el tiempo y el porcentaje de incremento de fragmentación del ADN *postmortem* (4/4.53, 24/7.62, 48/9.28, 72/20.13, 96/22.52, 120/36.38 h/%), encontrándose diferencias significativas ($P < 0.05$) a partir de las 72h *postmortem*, además se observó una correlación entre el porcentaje de fragmentación de ADN y la movilidad masal (-0.64167, $p < .0001$), movilidad progresiva (-0.66779, $p < .0001$) y viabilidad (-0.58483, $p < .0001$). En conclusión la integridad del ADN en el espermatozoide ovino es afectada por el tiempo *postmortem*, pudiéndose obtener células con menor daño antes de 48 h *postmortem*.

II. ABSTRACT

In mammals, the fully mature sperm nucleus is highly resistant to chemical treatment and physical stress due to disulfide cross-linking of nuclear protamines (Kaneko *et al.*, 2003). However, the stability of DNA can be affected by different internal or external factors, which may or may not produce irreversible damage to DNA, that is, depends on whether the type of injury is lethal or sub lethal (Kurtz, 2007). One of the factors that cause DNA damage is cellular autolysis, a process that begins with cellular hypoxia and the consequent depletion of ATP after the animal dies. Several studies indicate that sperm with defective DNA may have a morphology, motility and fertilization capacity normal but not to viable pregnancies, so the percentage of DNA fragmentation could be considered a factor affecting reproduction in mammals (Evenson *et al.*, 2002), especially when using assisted reproduction techniques, one of

these techniques is to obtain viable sperm from dead animals, because is possible recover sperm from the tail of the epididymis for several hours or even days after the death. So, the aim of this study was to evaluate the percentage of DNA damage in sperm of sheep, retrieved from the epididymis at different *postmortem* times, by Comet Assay (EC, highly sensitive technique to measure low levels of DNA fragmentation) and establish the association of this parameter which constitutes the normal semen analysis. For this, we obtained 60 pairs of testes trail and transported under refrigeration (4 ° C), morphometric analysis was performed for each of the testes (weight, length, width and weight of the epididymis), sperm were obtained later by epididymal *postmortem* washing retrograde at different times (4, 24, 48, 72, 96 and 120 h), spermogram and EC analysis was performed immediately. The data were analyzed using image analysis software (Comet Score Tritex-Corp.) and showing a relationship between time and percentage increase of DNA fragmentation *postmortem* (4/4.53 24/7.62, 48/9.28, 72/20.13 , 96/22.52, 120/36.38 h/%) and significant differences (P <0.05) was observed from 72h *postmortem*, also exist a correlation between the percentage of DNA fragmentation and mass motility (-0.64167, p <.0001) progressive motility (-0.66779, p <.0001) and viability (-0.58483, p <.0001). In conclusion, the integrity of sperm DNA in the sheep is affected by time *postmortem*, may be obtained cells with less damage within 48 h *postmortem*.

III. INTRODUCCIÓN

La fecundación es el proceso por medio del cual los gametos de un macho y una hembra, espermatozoide y ovocito, se unen para formar descendencia que genéticamente es diferente a ambos padres. El origen de los gametos masculinos, es decir, los espermatozoides está en los testículos, ahí deben sufrir una serie de transformaciones para convertirse de una célula esférica diploide a una célula flagelada haploide (Carlson, 2009); este proceso inicia en la pubertad y está caracterizado por un estadio premeiótico llamado espermatogénesis, un estadio meiótico y otro postmeiótico también conocido como espermiogénesis (Holstein *et al.*, 2003). Los espermatozoides al salir de los testículos son inmaduros, es decir aún no tienen la capacidad de fertilizar un ovocito (Yanagimachi, 2005), esta habilidad la adquieren a través de su paso por el epidídimo. Los espermatozoides, a través del paso por los conductos eferentes y el epidídimo, adquieren la habilidad de tener movimiento progresivo lineal y la capacidad de fertilizar al ocurrir cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos. En la cabeza del epidídimo ocurre la reabsorción de solutos y fluidos, en el cuerpo del epidídimo sucede la maduración espermática, y en la cola el almacenamiento de los espermatozoides maduros (Jones, 2004). El espermatozoide está formado por cabeza, pieza media y flagelo; en la cabeza se encuentra el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) espermático el cual es una macromolécula compleja que está formada por dos cadenas integradas por compuestos químicos llamados nucleótidos que se entrelazan entre sí formando una doble hélice. El ADN constituye el material genético de las células y está organizado de forma tal, que mantiene la cromatina compacta y estable por medio de proteínas llamadas protaminas (Kasinsky, 1989). En los mamíferos, el núcleo del

espermatozoide completamente maduro es muy resistente a tratamiento químico y a estrés físico, debido a las uniones cruzadas por puentes disulfuro de las protaminas nucleares (Kaneko *et al.*, 2003). Sin embargo, la estabilidad del ADN puede verse afectada por diferentes factores internos o externos, pudiendo producirse o no, daños irreversibles en el ADN, es decir, dependerá de si el tipo de lesión es letal o subletal (Kurtz, 2007). Diversos estudios indican que los espermatozoides con ADN defectuoso pueden tener una morfología, motilidad y capacidad de fecundación normales, pero no dar gestaciones viables, por lo que el porcentaje de fragmentación del ADN podría considerarse un factor que afecta la reproducción en los mamíferos (Evenson *et al.*, 2002). Por lo tanto, se evaluó el porcentaje del daño en el ADN de espermatozoides de ovino, recuperados del epididimo, en diferentes tiempos *postmortem*, mediante el Ensayo Cometa (EC, técnica con gran sensibilidad que mide niveles bajos de fragmentación del ADN) y se estableció la asociación de este parámetro con los que constituyen el espermograma habitual.

IV. ANTECEDENTES

1. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un proceso controlado por la secreción hipotalámica de gonadotropina (GnRH) que estimula la secreción de hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) por la glándula pituitaria (McLachlan, 2000). El propósito de la espermatogénesis es establecer y mantener una producción diaria de espermatozoides completamente diferenciados que en los mamíferos placentarios puede ir desde 200 millones (hombre) hasta 2-3 billones (toro). Esta masiva producción espermática requiere de una arquitectura única del epitelio seminífero, un sistema de auto almacenamiento con una barrera hemato testicular que los mantenga perfectamente aislados permitiendo únicamente el paso de factores paracrinos. Esta barrera selectiva semipermeable previene la infiltración de células del sistema inmunitario durante la maduración espermática, el tránsito y la eyaculación (Sutovsky y Manandhar, 2006).

La espermatogénesis es una secuencia de eventos que producen espermatozoides viables por medio de transformaciones nucleares y citoplásmicas, convierten una célula esférica diploide en cuatro células haploides flageladas, y tiene lugar en las gónadas masculinas, los testículos, específicamente en los túbulos seminíferos (Kerr, 1992). La pared de los túbulos seminíferos se halla revestida por un epitelio estratificado que descansa sobre una lámina basal. El epitelio germinal comprende dos clases de células: células de Sertoli y células germinales (espermatogonias, espermaticitos, espermátides y espermatozoides). Este proceso inicia en la pubertad y puede continuar hasta la vejez,

antes de la pubertad en el epitelio germinal sólo existen células de Sertoli y espermatogonias (Cortés, 1990). Consta de varias fases:

a) **Fase de proliferación o mitótica.** Próximas a la pared del túbulo seminífero de los testículos, se encuentran las espermatogonias, éstas han estado inactivas en los tubos seminíferos de los testículos desde el periodo fetal y comienzan a multiplicarse activamente por mitosis en la pubertad (Carlson, 2009).

b) **Fase de crecimiento.** Después de varias divisiones mitóticas, las espermatogonias crecen y experimentan cambios graduales y se denominan espermatocitos primarios o de primer orden, siendo las células germinales más voluminosas en los túbulos seminíferos (Carlson, 2009).

c) **Fase meiótica.** Posteriormente cada espermatocito primario experimenta una división de reducción, llamada primera división meiótica, para formar dos espermatocitos secundarios haploides que tienen aproximadamente la mitad de las dimensiones del espermatocito primario. Subsecuentemente estos espermatocitos presentan una segunda división meiótica y forman cuatro espermátides haploides, que miden aproximadamente la mitad del tamaño del espermatocito secundario (Carlson, 2009).

d) **Fase de diferenciación o espermiogénesis.** Las espermátides se transforman gradualmente en cuatro espermatozoides: se reduce el citoplasma, la cromatina se condensa, el núcleo se alarga y queda en la cabeza del espermatozoide, las mitocondrias se colocan en el cuello y los centriolos originan el flagelo (Carlson, 2009).

2. ESPERMIOGÉNESIS

La espermátide formada tiene núcleo redondeado central, aparato de Golgi bien limitado cerca del núcleo, abundantes mitocondrias granuladas y un par de centriolos pequeños. En esta fase las espermátides sufren una metamorfosis que consta de varias etapas (Carlson, 2009):

a) **Fase de Golgi.** En la espermátide el aparato de Golgi produce vesículas proacrosomales que se unen y forman el gránulo acrosomal que se adhiere a la membrana nuclear en lo que será el polo anterior del espermatozoide. Las mitocondrias migran hacia la periferia y del centriolo distal emerge un flagelo acompañado de membrana (Carlson, 2009).

b) **Fase de casquete.** La vesícula acrosomal se aplasta y se expande sobre la superficie del núcleo. Se visualizan el gránulo y el casquete. Las mitocondrias empiezan a emigrar hacia el flagelo (Carlson, 2009).

c) **Fase acrosomal.** El núcleo se hace excéntrico, se alarga y se deforma, y la cromatina se condensa. El acrosoma que está formado por lipoproteínas (contiene también enzimas como la hialurodinasa y la acrosina), se adapta a la forma del núcleo. El citoplasma con sus organelos se desplazan hacia atrás y las mitocondrias se colocan alrededor del flagelo (Carlson, 2009).

d) **Fase de maduración.** Al completar la espermátide su desarrollo, el excedente citoplásmico no utilizado se desprende en forma de cuerpo residual, que es fagocitado por una célula de Sertoli. La estructura básica del flagelo es la de un cilio en cuanto al número y la disposición de los microtúbulos, sin embargo por fuera del anillo de 9 microtúbulos dobles existen además varias fibras gruesas (fibras densas externas), nueve en la porción proximal del flagelo y una vaina fibrosa (Carlson, 2009).

Algunas estructuras y moléculas aparecen transitoriamente durante la espermiogénesis y desaparecen una vez que el espermatozoide está plenamente diferenciado. Estas incluyen:

1. Proteínas de transición (TP1, TP2) que son intermediarias durante el cambio de histonas a protaminas en el núcleo espermático (Meistrich *et al.*, 2003).
2. Gránulos pro-acrosomales que son producidos por el aparato de Golgi y que eventualmente son acoplados a la superficie apical del núcleo espermático para formar el gránulo acrosomal y posteriormente al capuchón acrosomal (Sutovsky y Manandhar, 2006).
3. Tubo caudal o manchette el cual es una estructura formada por una nucleación alrededor del segmento ecuatorial acrosomal en el ratón (Kierszenbaum, 2002).

El resultado neto de la transformación de una espermátide es el espermatozoide, el cual es de menor tamaño y conserva el componente nuclear en la cabeza, parte del aparato de Golgi en el acrosoma, mitocondrias en la pieza intermedia y los centriolos (Cardona y Cadavid, 2004).

3. ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide (del griego *sperma*, semilla y *zoo*, animal) es la célula final de un largo y complejo proceso de diferenciación celular, es una célula muy bien adaptada para el movimiento, altamente especializada para el almacenamiento de material genético y con una limitada

capacidad de auto-reparación (Aurich, 2005). La célula germinal masculina se produce en la gónada (testículo) mediante un proceso permanente de división de las células germinales o espermatogonias conocido como espermiogénesis, durante este proceso ocurren una serie de eventos en el epitelio de los túbulos seminíferos controlado hormonalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que culmina con la formación de espermatozoides maduros a partir de las células precursoras (espermatogonias). Durante la espermiogénesis los organelos de los espermatozoides son modificados morfológica y funcionalmente, por lo que la célula espermática madura carece de un grupo importante de organelos (retículo endoplásmico, complejo de Golgi, lisosomas y peroxisomas) para la síntesis y degradación de componentes celulares, con la finalidad de tener las características apropiadas de una célula germinal capaz de fertilizar al ovocito (Fawcett, 1975; Fleisch y Gadella, 2000). En su estructura presenta cinco partes: La **cabeza** del espermatozoide contiene al núcleo, delimitado por la membrana nuclear, donde se encuentra la cromatina altamente condensada; las histonas fueron parcialmente reemplazadas durante la espermiogénesis por protaminas, proteínas cargadas positivamente que permiten la hipercondensación del núcleo espermático (Brewer *et al.*, 2002). Su número cromosómico y contenido nuclear (ADN) es haploide. En la región apical, se encuentra el acrosoma que es una vesícula altamente especializada que contiene enzimas necesarias para la penetración a través de la zona pelúcida del ovocito. La cabeza para su estudio se ha dividido en tres dominios de membrana: el de la región apical o subacrosomal, el de la región ecuatorial y el de la región posacrosomal. La **pieza de conexión** o cuello del espermatozoide, se extiende desde la cabeza en la base del núcleo hasta la pieza media del flagelo. La **pieza media** del espermatozoide se extiende desde la región

distal de la pieza de conexión hasta el anillo de Jensen (*annulus*); en la pieza media se distinguen el axonema, la vaina mitocondrial y las fibras densas (Eddy *et al.*, 2003). El axonema ocupa el eje central de todo el flagelo (pieza media, principal y final), está constituido por dos microtúbulos sencillos rodeado de nueve dobletes de microtúbulos y sus proteínas asociadas. La vaina mitocondrial que rodea al axonema se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de mitocondrias distribuidas sobre su circunferencia, las cuales contienen enzimas y cofactores necesarios para la producción de ATP, que a su vez es necesario para la actividad contráctil del flagelo. Las fibras densas son estructuras citoesqueléticas dispuestas entre la vaina mitocondrial y cada uno de los microtúbulos periféricos del axonema (Alberts *et al.*, 2002). La **pieza principal** es el segmento más largo del flagelo. Se extiende desde el anillo de Jensen hasta el extremo proximal de la pieza terminal, pudiendo distinguirse las estructuras siguientes: vaina fibrosa, fibras densas, anillo de Jensen y axonema. La **pieza terminal** es el segmento final y el más corto del flagelo del espermatozoide, está formado por el axonema envuelto directamente por la membrana plasmática. Mediante el movimiento de la cola o flagelo los espermatozoides son capaces de moverse y ascender a través del cuello uterino hacia las trompas de Falopio donde pueden encontrar al óvulo (Yanagimachi, 2005).

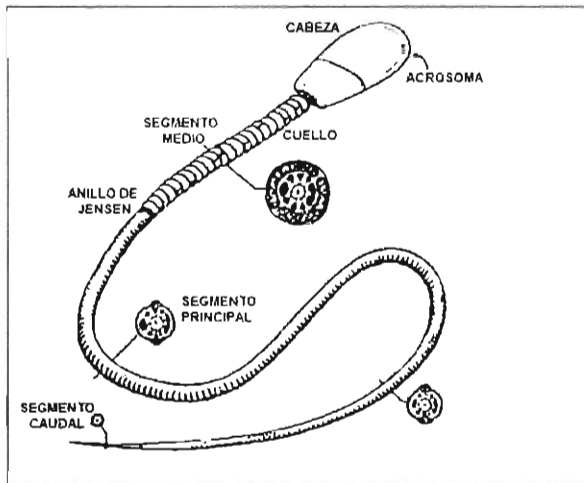


Fig. 1 Partes del espermatozoide (adaptado de Garner y Hafez, 1996).

4. EPIDÍDIMO

El epidídimo del griego *epi* (sobre) y *didymoi* (gemelos), es un túbulo elongado y tortuoso empaquetado en un saco de tejido conectivo que contiene fibroblastos, colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras nerviosas, macrófagos, leucocitos y capas concéntricas de fibras musculares que se van incrementando desde la cabeza hasta la cola; es una extensión de la túnica albugínea, se localiza en la superficie posterior del testículo y conecta los vasos eferentes a la salida del testículo, con el conducto deferente. Histológicamente, la cabeza se caracteriza por presentar un epitelio pseudoestratificado con estereocilios (microvellosidades muy largas, flexibles y que se enroscan entre sí en los extremos; su función es aumentar la superficie e intervienen en la absorción de líquidos); el cuerpo presenta una luz amplia y los estereocilios están generalmente curvados y algunas veces bifurcados, se pueden observar vacuolas supranucleares. En la última

porción, la cola, los estereocilios son cortos y en menor cantidad, la luz del túbulo es amplia y densamente ocupada con espermatozoides (Setchell *et al.*, 2005).

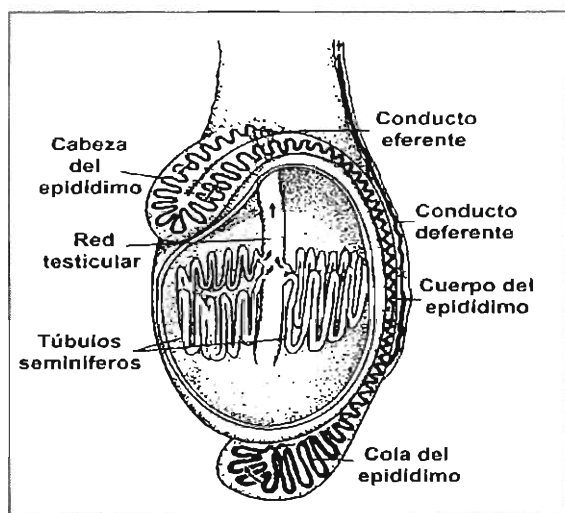


Fig. 2 Asas de los túbulos seminíferos, la red testicular y el conducto epididimario (adaptado de Setchell B., 1977)

El epidídimo está irrigado por dos arterias: la cabeza, el cuerpo y la región proximal de la cola están irrigados por ramificaciones de la arteria espermática proveniente del plexo pampiniforme, mientras que la cola es irrigada por la arteria deferente, rama de la arteria iliaca interna. Las venas epididimales siguen la misma ruta que sus respectivas arterias. Vasos linfáticos salen del epidídimo en varios puntos, de la cabeza salen el mayor número de éstos, el cuerpo es drenado por dos vasos y un solo vaso linfático sale de la cauda. Estos vasos se fusionan y entran en el tronco linfático testicular, que acompaña a la arteria espermática, hasta llegar al grupo de linfonodos para-aórtico. La inervación del epidídimo está dada por los nervios espermático medio e inferior. La

cabeza y el cuerpo están escasamente inervados en la rata, el conejo, el cerdo de guinea y el hombre, pero en el gato y el perro estas regiones están ricamente inervadas; mientras que en la cola, la inervación aumenta conforme las capas de músculo liso se incrementan alrededor del conducto deferente (Guyton, 2006). Desde el punto de vista funcional el epididimo se divide en tres segmentos (Fig. 2): *caput*, *corpus* y *cauda* (Turner, 2008). La cabeza está formada por los conductillos eferentes que forman una masa contorneada de gran tamaño que se asienta en el polo posterosuperior del testículo. El cuerpo es un conducto largo y contorneado en el que drenan todos los conductillos eferentes y que continúa en sentido inferior a lo largo del borde posterolateral del testículo aumentando de tamaño para formar la cola en el polo inferior del testículo la cual se continúa con el conducto deferente (Johnson y Everitt, 2007); la maduración o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides ocurre en este segmento: los espermatozoides que entran en el epididimo son infértiles pero adquieren su capacidad fertilizante durante el proceso de maduración que se da en la parte media del epidídimo que comprende la mayor parte de la cabeza y el cuerpo. La cola del epidídimo, junto con la zona proximal del conducto deferente participa en el almacenamiento de espermatozoides maduros (Jones, 2004).

4.1 Maduración espermática epididimal

Aunque los espermatozoides en los túbulos seminíferos parecen maduros morfológicamente, son inmóviles e incapaces de fecundar (Inaba, 2003), de allí que el transporte inicial a la *rete testis* es dependiente del fluido secretado por las células de Sertoli. En los conductos eferentes, cabeza y cuerpo del epididimo, el transporte es mediado por el epitelio del epidídimo, específicamente las células

ciliadas y las principales, y contracciones peristálticas de la musculatura lisa de los conductos eferentes y la cabeza y cuerpo del epidídimo, más la presión hidrostática interna (Carlson, 2009). El control de la función epididimal está dado en parte por andrógenos de origen testicular y posiblemente por factores no hormonales en el fluido de la *rete testis*. Esta hipótesis fue estudiada por medio de orquiectomía, con lo que se detuvo la producción de testosterona y otros factores de origen testicular, induciendo infertilidad al modificar la arquitectura del epitelio del epidídimo proximal (Cyr, 2001; Setchell *et al.*, 2005). En contraste, la vasectomía no altera la transmisión al epidídimo de factores secretados en los testículos (Flickinger, 1985). Adicional a la secreción de macromoléculas que se unen al espermatozoide durante su maduración, se da la secreción de iones de bajo peso molecular y osmolitos orgánicos que se presume, el espermatozoide obtiene durante el tránsito epididimal proporcionándole la capacidad de regular su volumen cuando lo necesita y manteniendo la quiescencia del espermatozoide al conservar el volumen de Na bajo y el del K alto, esto también permite la unión de proteínas en la superficie del espermatozoide (Cooper y Yeung, 2006).

Parámetro	Unidades	Fluido de Espermatocele ¹	Referencia	Fluido de Epidídimo (cola)/ Conducto deferente ²	Referencia
K ⁺	mM	5.9	Cooper <i>et al.</i> , 1992	111	Hinton <i>et al.</i> , 1981
Na ⁺	mM	148	Cooper <i>et al.</i> , 1992	30	Hinton <i>et al.</i> , 1981
Ca ⁺	mM	2.1	Cooper <i>et al.</i> , 1992	1.5	Morton <i>et al.</i> , 1978

Cl ⁻	mM	139	Cooper <i>et al.</i> , 1992	103	Hinton <i>et al.</i> , 1981
Fosfato	μM	27.3	Cooper <i>et al.</i> , 1992	24.4	Hinton <i>et al.</i> , 1981
Andrógeno	nM	66	Cooper <i>et al.</i> , 1992	0.28	Adamopoulos <i>et al.</i> , 1979
Carnitina	mM	0	Cooper <i>et al.</i> , 1992	5.5	Hinton <i>et al.</i> , 1981
Inositol	mM	2	Pruneda y Cooper	5.9	Hinton <i>et al.</i> , 1981

Tabla 1. Composición de fluidos que entran¹ y salen² del epidídimo humano.

En los últimos años, la aplicación de técnicas de biología molecular en el estudio del epidídimo humano ha proporcionado evidencia de muchas proteínas nuevas, y de que el espermatozoide está sujeto a un ambiente siempre cambiante en el epidídimo, lo que conduce a que entre en contacto con factores que tienen el potencial de modificar las interacciones espermatozoide-ovocito (Cooper y Yeung, 2006).

Proteínas relacionadas con la maduración	Posible acción
MIF	Movilidad/inmunidad?
Clusterin	Acrosoma?
SPAM1/PH20	Zona de unión?
P34H	Zona de unión?

4A8	Zona de unión?
Fibronectina	Zona de unión?
SPAM1 (PH200)	Hialuronidasa/zona de unión?
FLB1 (SOB1)	Fusión con vitelo
SOB2	Fusión con vitelo
hBD5,6	Antibacteriano
CRISP/ARP (AEGL1)	Fusión con vitelo
Cistatina 11	Proteasa
ADAM7/GP39	Metaloproteasa
HE4	Inhibidor de proteasas
HE1/EPV20	Fluidez de membrana

Tabla 2. Proteínas humanas epididimales relacionadas con la maduración y su posible acción durante la fertilización (Cooper, 2007a,b).

Proteínas relacionadas con el almacenaje	Posible acción
CD52 (HE5, gp20)	Descapacitación?/fusión?
LPB	Inmunidad?
Eppin 1,2	Antibacterial/inhibidor de proteasas
SOB3 (CAP18)	Antibacterial/zona de unión?
MIG/CXLC9	Antibacterial
HE2a/b 1/2b 1/2b2/g	Antibacterial
DEFB118 (E5C42)	Antibacterial
EP2	Antibacterial
Semenogelin I	Antibacterial
LCN6	Zona de unión
MUC20	Antibacterial

Tabla 3. Proteínas humanas epididimales relacionadas con el almacenaje y su posible acción en la fertilización (Cooper, 2007a,b)

Los cambios que se dan en el espermatozoide durante su paso por el epidídimo incluyen el desarrollo del potencial para moverse hacia

adelante y progresivamente, cambios metabólicos, pérdida de la gota citoplásmica y cambios en la membrana plasmática, el acrosoma y el material nuclear o ADN (Carlson, 2009).

5. ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

El Ácido Desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula compleja, que constituye el material genético de las células. Está compuesta por unidades que están ordenadas según una secuencia que contiene la información para la síntesis de proteínas. La molécula de ADN está formada por dos cadenas formadas por compuestos químicos llamados nucleótidos. Los nucleótidos están formados por un ácido fosfórico, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Existen cuatro tipos de nucleótidos diferenciados por sus bases nitrogenadas; adenina, guanina (purinas), citosina y timina (pirimidinas). Cada nucleótido posee una afinidad química con aquel que se encuentra en paralelo en la otra cadena; la adenina tiene afinidad con la timina, y la citosina con la guanina (Fig. 3). Un elemento esencial en esta estructura es la manera en que las dos cadenas se unen por puentes de hidrógeno entre las bases: las bases nitrogenadas (hidrofóbicas) se encuentran apiladas en el interior de la doble hélice, en planos perpendiculares a su eje, la parte exterior (grupo fosfato y azúcar) es hidrofílica. Las bases de una de las cadenas o hebras están unidas mediante puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas de la otra cadena o hebra, uniendo ambas cadenas. De esta manera, una purina de una de las cadenas se encuentra enfrentada y unida a una pirimidina en la otra cadena, por ello el número de purinas es igual al número de pirimidinas. Adenina se une a Timina con dos puentes de hidrógeno mientras que Citosina se une Guanina

con tres puentes de hidrógeno (enlace más estable). Esta correspondencia estricta (A-T y G-C) hace a las dos cadenas o hebras complementarias, es decir, una es el molde para la otra, esta propiedad permite una replicación exacta (replicación semi-conservativa) (Alexander *et al.*, 1992).

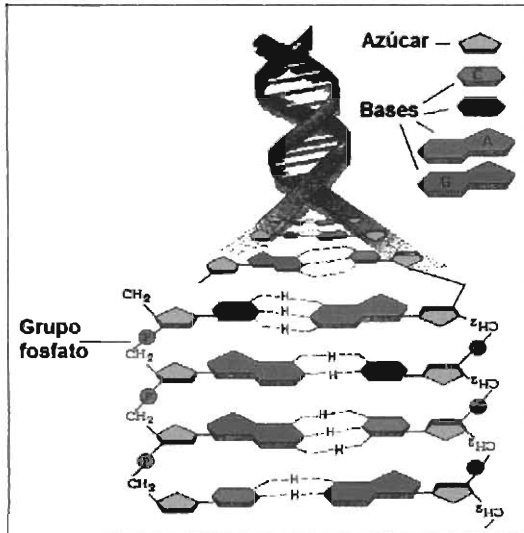


Fig. 3 Molécula de ADN
(adaptado de www.lookfordiagnosis.com)

5.1 Empaquetamiento del ADN

La unidad fundamental de la cromatina (del griego *khroma*, coloreado), denominada nucleosoma, está compuesta de ADN e histonas. Esta estructura es la base del primer nivel de compactación del ADN en el núcleo, consiste en el enrollamiento del ADN alrededor de un cuerpo central formado por 8 moléculas de histonas con una región central altamente estructurada denominada dominio de plegamiento de histonas.

Las histonas se pueden clasificar en histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4) e histonas de unión (H1), son proteínas pequeñas con carga positiva, que contienen numerosos residuos de arginina y lisina. Las cargas positivas de las histonas se unen a las cargas negativas del esqueleto fosfodiéster del ADN, lo que permite una importante interacción iónica. Las histonas H3 y H4 tienen más residuos de arginina que de lisina, mientras que las histonas H2A y H2B, tienen un mayor número de residuos de lisina que de arginina (Simon y Felsenfeld, 1979; Zlatanova *et al.*, 1998). Las histonas se distribuyen en el octámero como una superhélice espiral de proteínas que forma una rampa sobre la que se coloca el ADN (Arents y Moudrianakis, 1993). Cada octámero tiene aproximadamente 1.7 vueltas de ADN alrededor suyo y cada nucleosoma es conectado al siguiente por un ADN de unión, la longitud del cual varía dependiendo de la especie (Fig. 4). La formación de la fibra nucleosomal compacta el ADN 7 veces y produce una fibra de cromatina de 10nm de diámetro (Sumner, 2003). Las histonas H1 se disponen de manera que forman el eje central sobre el que se enrollan los nucleosomas. Por cada vuelta de la espiral que forma esta fibra hay seis nucleosomas. A este enrollamiento de los cromosomas sobre sí mismos se le llama solenoide (Fig. 5) (Finch y Klug, 1976).

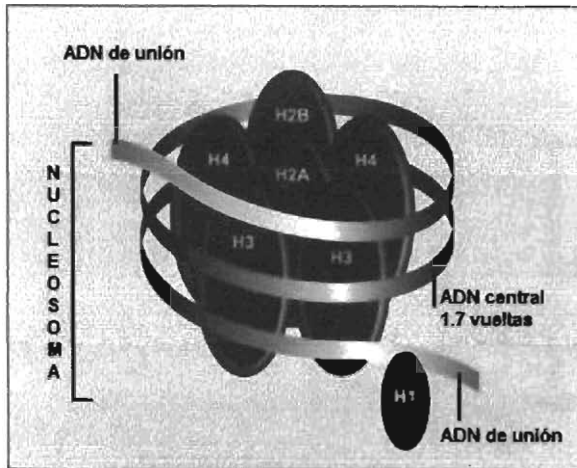


Fig. 4 Estructura del nucleosoma. Consiste en el enrollamiento del ADN alrededor de un cuerpo central formado por 8 moléculas de histonas. H1 forma el eje central sobre el que se enrollan los nucleosomas (adaptado de: www.lookfordiagnosis.com).

Los solenoides también siguen un proceso de enrollamiento y forman los bucles (Fig. 5) de cromatina (Griffith, 1976). Seis bucles formarían una roseta y treinta rosetas seguidas un rodillo (Fig. 5) (Sumner, 2003). El siguiente nivel son los cromosomas (Fig. 5) que representan el nivel máximo de compactación, cada especie tiene un número característico. La mínima secuencia de ADN que es capaz de codificar una función o una estructura completa se denomina gen. Sin embargo, existen secuencias no codificantes que contribuyen a dar estabilidad a la molécula (Zlatanova *et al.*, 1998).

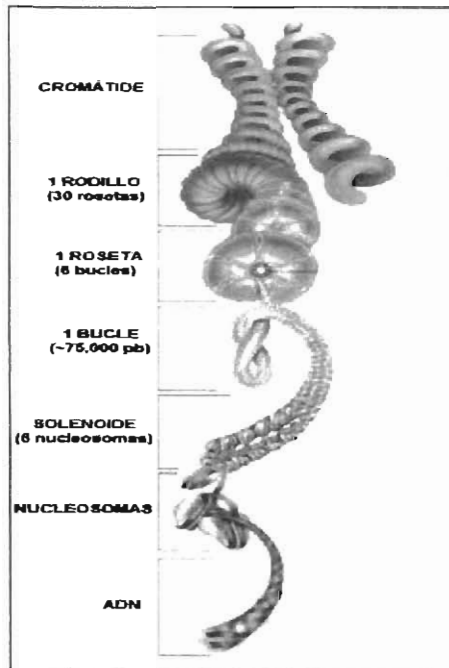


Fig. 5 Condensación del ADN en células somáticas (adaptado de: www.mcb.illinois.edu)

5.2 Estructura de la cromatina espermática

En el espermatozoide, este empaquetamiento se ha vuelto mucho más compacto, lo que reduce el tamaño de la cabeza del espermatozoide y lo hace más hidrodinámico (Braun, 2001). En el transcurso de la espermiogénesis, el núcleo celular sufre un proceso de condensación progresiva que va a proteger la integridad del material genético durante el transporte a través del tracto femenino (De Jonge, 2000). Tal condensación se debe a cambios en las proteínas que interaccionan con el ADN, de manera que las histonas de las espermátides van siendo sustituidas por proteínas llamadas protaminas (Fig. 6), las cuales a diferencia de las histonas de las células somáticas que constituyen la

familia de proteínas más conservadas de la evolución, pueden variar de especie en especie e incluso entre poblaciones de una misma especie (Kasinsky, 1989). Una de las características de la protamina es su basicidad, dada por la presencia de residuos de arginina que es un aminoácido muy básico capaz de neutralizar electrostáticamente las cargas negativas de los grupos fosfato de las cadenas de ADN permitiendo su máxima aproximación, lo cual produce el denso empaquetamiento del núcleo en el espermatozoide. Adicionalmente, la disposición agrupada (clúster) de las argininas confiere un comportamiento cooperativo a la molécula de protamina en su interacción con el ADN. La arginina y la lisina (otro aminoácido básico) se encuentran siempre presentes en todas las proteínas nucleares espermáticas, sin embargo, los distintos aminoácidos que separan a los clústeres varían entre especies con excepción de uno de ellos, la serina, que aparece siempre acompañando a los aminoácidos básicos. La serina junto con la treonina, es un residuo aminoacídico que tiene la capacidad de poder ser fosforilado (y desfosforilado) por enzimas celulares (a su grupo $-OH$ terminal se le puede unir un grupo fosfato PO_4H_2) convirtiéndola en fosfoserina. Esta fosforilación de las serinas en las proteínas nucleares espermáticas disminuye la afinidad electrostática de las proteínas por el ADN (por introducción de grupos de carga negativa en la molécula). Esta disminución de la afinidad produce una interacción ordenada protamina-ADN cuando estas moléculas penetran en el núcleo espermático y desplazan a las histonas. Esta fosforilación de las protaminas también es necesaria antes de la fusión de los pronúcleos masculino y femenino como paso indispensable a la expulsión de la protamina del espermatozoide (Kurtz, 2007). La presencia de cisteína en las protaminas de los mamíferos placentarios, se considera como un mecanismo esencial para la estabilización de la

estructura de la cromatina nuclear, a través de la formación de enlaces disulfuro en el núcleo del espermatozoide (Balhorn, 1989; Bedford *et al.*, 1974), lo que hace al ADN más resistente a estrés oxidativo a diferencia de los mamíferos marsupiales en los cuales sus protaminas no tienen residuos de cisteína y como consecuencia su ADN es más susceptible a daño oxidativo (Bennetts y Aitken, 2005). El rol principal del espermatozoide es depositar el genoma paterno en las mejores condiciones al ovocito y esta condensación del ADN espermático lo protege durante el tránsito en el tracto reproductor de la hembra, sin embargo, es importante mencionar que esta condensación es necesaria para la fertilización y no para el desarrollo embrionario, como lo demostraron Kimura y Yanagimachi (1995) y Ogura *et al.* (1994), quienes inyectaron el núcleo de espermatozoides en ovocitos, lo que resultó en el desarrollo de embriones y la obtención de crías vivas (77%), la cromatina en los espermatozoides está organizada por medio de histonas al igual que en células somáticas (Meistrich *et al.*, 2003) por lo que la condensación del ADN que ocurre durante la espermiogénesis no es necesaria para la embriogénesis.

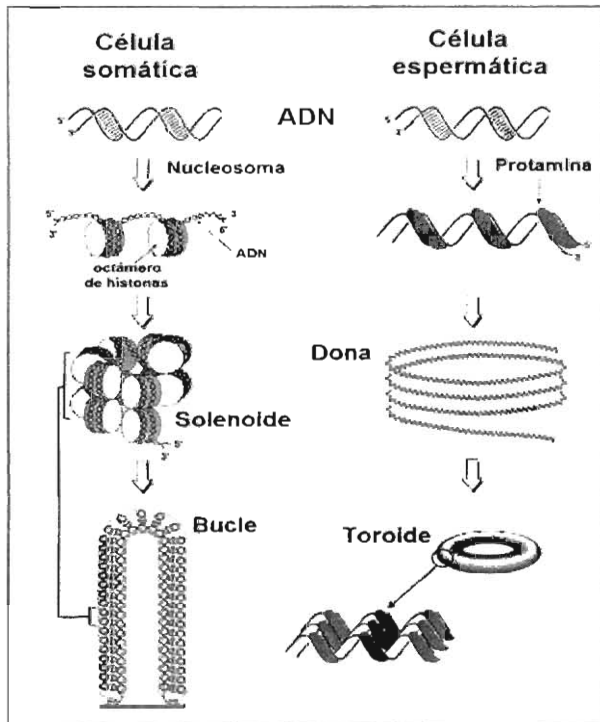


Fig. 6 Intercambio de histonas por protaminas en el espermatozoide (adaptado de Ward, 1994)

Esta condensación del ADN espermático es tan fuerte que puede ser resistente a estrés mecánico producido por sonicación (Tateno *et al.*, 2000) e incluso al calor (Yanagida *et al.*, 1991), factores que destruyen el ADN en las células somáticas, sin embargo, existen diversos agentes a los cuales es susceptible el ADN espermático, viéndose afectada la integridad de esta molécula por fracturas tanto en la doble cadena como en la cadena sencilla. Tan sólo una fractura en cualquier lugar de la molécula que no sea eliminada adecuadamente por los mecanismos de reparación celular ocasiona una inestabilidad de los cromosomas en las

siguientes divisiones celulares provocando serios problemas a la célula que la posee y a su descendencia (Braun, 2001).

5.3 Tipos de fragmentación del ADN

La etiología del daño nuclear espermático es multifactorial, dada por factores internos y externos que pueden producir daños irreversibles en los gametos (Kurtz, 2007).

Fractura de cadena simple: Se produce en el enlace fosfodiéster, entre el fosfato y la desoxirribosa, o más frecuentemente entre la base nitrogenada y la pentosa. Ocurre de tres a cuatro veces más en las células bien oxigenadas que en las hipóxicas. Tras la ruptura del enlace fosfodiéster las dos cadenas de ADN se separan con penetración de moléculas de agua en esa zona, rompiéndose los puentes de hidrógeno entre las bases. A la ruptura simple de cadena también se le llama lesión subletal (Braun, 2001).

Fractura de cadena doble: Es una lesión compleja que se produce como consecuencia de la ruptura de las dos hebras del ADN en sitios muy próximos tras la interacción única o por combinación de dos fracturas simples de cadenas complementarias. La fractura doble es homóloga cuando ocurre al mismo nivel de pares de bases y heteróloga en caso contrario, siendo ésta más frecuente. A la fractura de cadena doble se le conoce también como lesión letal, porque existe una estrecha relación con la muerte celular (Braun, 2001).

La fragmentación del ADN espermático, como indica su nombre, se refiere a rupturas o lesiones en el material genético del espermatozoide. A mayor número de lesiones, menor será la integridad del material

genético y las probabilidades de que se produzca una gestación a término. En algunos casos el ovocito puede reparar el daño del ADN del espermatozoide que lo ha fecundado (Matsuda y Tobarí, 1988; Genesca *et al.*, 1992). Esto va a depender de varios factores (Ahmadi y Ng, 1999):

- 1.- El tipo de lesión del ADN.
- 2.- El porcentaje de ADN del espermatozoide afectado.
- 3.- La calidad del ovocito, ya que de ello va a depender si se puede reparar o no el daño de ADN en el espermatozoide. Este parámetro está generalmente ligado a la edad de la hembra.

5.4 Causas de fragmentación del ADN espermático

El ADN espermático puede ser dañado por diferentes agentes endógenos y exógenos (Caldecott, 2007). Los principales agentes endógenos son las especies reactivas al oxígeno generadas por el metabolismo celular normal (Bohr, 2002).

5.4.1 Factores internos de tipo inorgánico

Durante el metabolismo aeróbico normal, las mitocondrias consumen oxígeno molecular y lo reducen secuencialmente hasta producir agua, sin embargo se estima que aproximadamente 2% del oxígeno consumido durante la respiración celular no es completamente reducido a agua (Inoue *et al.*, 2003) y los inevitables productos intermedios de esta reacción son conocidos como radicales libres: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que no es muy reactivo, pero sí abundante en los ambientes biológicos; después de la transferencia de un segundo electrón al superóxido, se genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que no es un radical libre, pero sí un fuerte oxidante citotóxico. El ión Fe^{2+} o el ión Cu^{2+} que se

encuentran en la célula principalmente como cofactores o unidos a proteínas, son capaces de transferir un tercer electrón al H_2O_2 (reacción de Fenton) causando rompimiento del enlace O-O para formar un anión y un hidroxilo ($OH\cdot$) el cual es muy reactivo y a diferencia del H_2O_2 que puede circular libremente a través de las membranas, el hidroxilo sólo actúa en el lugar donde se generó (Clarkson y Thompson, 2000; McCord, 2000). Debido a la relevancia del oxígeno en los procesos aeróbicos, los radicales libres con oxígeno reactivo son los más comunes, estos son átomos o grupos de átomos que tienen uno o más electrones desapareados o libres, son muy reactivos y tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica; una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre al quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena (Finkel y Holbrook, 2000). Actualmente, debido a que se han encontrado especies químicas que se comportan como oxidantes pero no son radicales libres, se ha optado por utilizar el término Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) en el que se incluyen el superóxido, peróxido de hidrógeno, hidroxilo, peroxilo, alcoxilo, hidroperóxido, metabolitos epóxido y el oxígeno singulete. De igual forma el término Especie Reactiva se ha extendido para denominar a las Especies Reactivas del Nitrógeno, del Cloro y del Bromo (Halliwell, 2006).

5.4.2 Factores internos de origen orgánico

Los problemas en la estructura de la cromatina se pueden dar durante la espermiogénesis si las actividades de corte y unión de la topoisomerasa II son anormales, cuando esto sucede se encuentran altos niveles de

fragmentos de ADN en las espermátides. La presencia de estos fragmentos indica la necesidad de aliviar la tensión que se produce en el superenrollamiento asociado en el cambio de histonas por protaminas y la modificación a espermátides, por lo tanto, la producción de estos fragmentos es necesaria (Roca y Mezquita, 1989; McPherson y Longo, 1993). Sin embargo, si la actividad de la topoisomerasa II es anormal o es bloqueada por inhibidores de ésta, los fragmentos no pueden ser reparados apropiadamente. Normalmente estas células entrarían en apoptosis, sin embargo algunos espermatozoides escapan a este mecanismo (Morse-Gaudio y Riskey, 1994). La apoptosis o muerte celular programada se caracteriza por la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, compactación de los organelos citoplasmáticos, dilatación del retículo endoplásmico, disminución del volumen celular y alteraciones de la membrana plasmática, estos cambios permiten el reconocimiento y fagocitosis de la célula (Arends y Wyllie, 1991). La apoptosis interviene en la degradación de las células germinativas para regular la sobreproducción (Sinha *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1997) y restringe el nivel de proliferación normal durante condiciones no favorables para el desarrollo del espermatozoide (Pentikainen *et al.*, 1999). La mayor característica de la apoptosis es la ruptura doble en el ADN a partir de la activación de endonucleasas (Gorczyca *et al.*, 1993). En las células somáticas la apoptosis se da por una cascada de eventos, incluyendo la formación de cuerpos apoptóticos que pueden ser vistos al microscopio. Sin embargo, en las espermátides o en el espermatozoide estos eventos han sido modificados, por ejemplo, la alta condensación en el ADN espermático limita la formación de cuerpos apoptóticos (Sinha *et al.*, 1995), aunque Baccetti *et al.* (1996) reportaron su presencia. Además la apoptosis de organelos y citoplasma se ha modificado en el espermatozoide maduro, por consiguiente, los

espermatozoides marcados para degradarse por apoptosis pueden tener actividad mitocondrial así como movilidad (Barroso *et al.*, 2000) y morfología normales (Host *et al.*, 2000a, b). Los espermatozoides eyaculados con marcadores apoptóticos aparentemente escaparon a la muerte celular programada, por consiguiente es importante distinguir entre células que muestran niveles altos de rupturas en el ADN y células que son positivas a marcadores apoptóticos (Evenson *et al.*, 2002). También se puede producir fragmentación del ADN espermático durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo. Uno de los mecanismos principales es el relacionado con la producción de radicales libres, ya sea por espermatozoides inmaduros o por las células epiteliales del epidídimo, que dañan directamente el material genético del espermatozoide (Larson *et al.*, 2003). El espermatozoide es muy sensible a las ERO, principalmente en la forma de radicales libres (Koshimoto *et al.*, 2000). Las ERO afectan la actividad del espermatozoide ya que contribuyen en importantes funciones fisiológicas cuando sus niveles son bajos, sin embargo cuando sus niveles son altos puede ser patológico (Beckman y Ames, 1997). A niveles normales, las ERO modulan la actividad proteínica, que es vital para la proliferación, diferenciación y función del espermatozoide, mientras que cuando son elevados están implicados en la actividad anormal de la topoisomerasa II, la apoptosis y la necrosis. En condiciones normales la generación de ERO es controlada por los antioxidantes, bajo esta condición el H₂O₂ interviene en la movilidad del espermatozoide a través del tracto genital femenino y de las células de la granulosa (Bize *et al.*, 1991). El exceso de ERO puede ser producido por el espermatozoide si este retiene citoplasma residual en la pieza media (Gómez *et al.*, 1996). En casos de oligospermia se ha reportado que los espermatozoides pueden generar por sí mismos un exceso de ERO (Aitken *et al.*, 1992), mientras que en

humanos fértiles los leucocitos presentes en el eyaculado (aún a bajas concentraciones) generan una gran cantidad de ERO (Aitken *et al.*, 1995).

5.4.3 Factores externos

Las causas exógenas incluyen agentes ambientales como la luz ultravioleta, radiación ionizante, químicos y toxinas (Norbury y Hickson, 2001). Entre los principales agentes exógenos que pueden causar daño en el ADN del espermatozoide y causar trastornos en la descendencia se encuentran:

Los **compuestos disruptores endocrinos** (CDE) los cuales pueden presentar actividad estrogénica, antiestrogénica o antiandrogénica; son altamente lipofílicos por lo que se almacenan por períodos prolongados en el tejido adiposo, tienen una baja solubilidad en el agua y una considerable resistencia a la degradación (Skakkebaek *et al.*, 2005). Entre los CDE, están los bifenilos policlorados (PCB), como el CB-153, que son compuestos clorados persistentes, bioacumulables y potencialmente tóxicos. Desde su identificación en el ambiente en 1966 se consideran presentes en los compartimentos ambientales: el CB-153 tiene una vida media de 17 años (Norén y Meironyté, 2000). Rignell *et al.* (2005) encontraron una asociación entre la presencia de CB-153 en suero sanguíneo y el índice de fragmentación del ADN en el espermatozoide en pescadores daneses. Algunos **fármacos** utilizados como anticancerígenos como la ciclofosfamida, que actúa a través de la producción de uniones cruzadas intercordonales pueden provocar fracturas y dificultar la reparación del ADN (Codrington *et al.*, 2007), además Harrouk *et al.* (2000) encontraron que puede alterar la expresión

de genes de reparación de ADN en embriones de ratas. El **humo del tabaco** es una potente fuente de estrés oxidativo, incrementa el daño en el ADN en un 50% y provoca apoptosis de células HFL-1 (Fraga *et al.*, 1996; Carnevali *et al.*, 2003), por otra parte Sepaniak *et al.* (2006), encontraron un mayor porcentaje de ADN fragmentado en contraste con no fumadores (32% vs 25.9%, $p < 0.01$), además de también provocar envejecimiento celular (Nyunoya *et al.*, 2009). En casos de **intoxicación por hierro** se ha visto un incremento significativo de 8-oxodesoxyguanosina en espermatozoides de rata (Wellejus *et al.*, 2000). Mientras que el **arsénico** es considerado un agente carcinogénico, los mecanismos implicados en esto incluyen estrés oxidativo, aberraciones cromosomales, alteración en factores de crecimiento, proliferación celular y alteración en la reparación del ADN (Kitchin, 2001). Las lesiones más comunes son cambios en la secuencia del ADN como delección, duplicación, amplificación y translocación (Fergusson y Alt, 2001). El **aumento de la temperatura** testicular por anomalías anatómicas puede ser otro factor de daño: se ha reportado el aumento de la producción de peroxinitrito en células espermáticas en humanos con varicocele, esto es debido al incremento de la actividad de NO sintasa y xantina oxidasa resultando la formación de NO, posiblemente superóxido y el altamente reactivo peroxinitrito (Mitropoulos *et al.*, 1996).

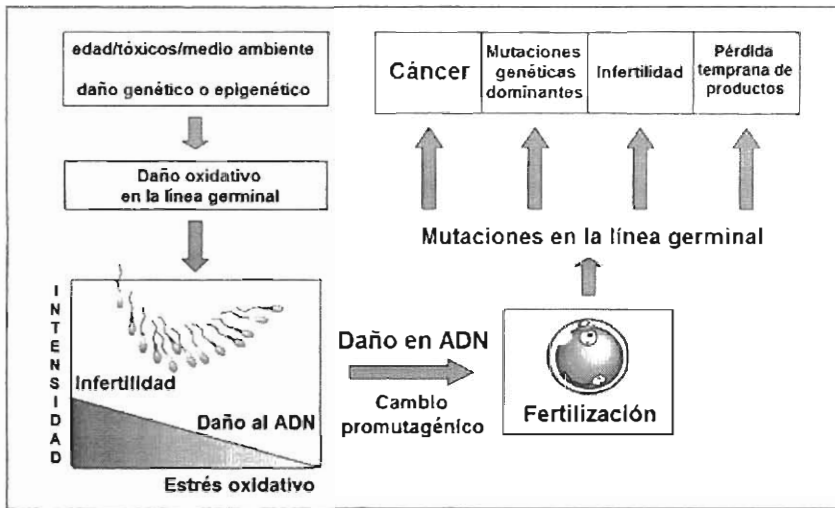


Fig. 7 Posibles mecanismos en que el estrés oxidativo en el espermatozoide puede generar trastornos en la descendencia (adaptado de Aitken y Bennetts, 2006).

6. HIPOXIA CELULAR POSTMORTEM

La muerte también tiene efectos sobre la integridad del ADN en el espermatozoide, es un proceso que generalmente inicia con la disminución del aporte de oxígeno al cerebro, continúa con la muerte neuronal y posteriormente la muerte somática, es decir, el cese total e irreversible de todos los órganos y sistemas de un organismo, esto evolucionará hacia la muerte celular, última fase en el proceso de muerte de un individuo. Las necesidades de O_2 son muy altas en la masa encefálica, razón por la cual es el primer órgano en morir, mientras que el músculo cardíaco puede sobrevivir horas y el riñón alrededor de 45 minutos (Jaramillo, 1993). Varios investigadores han obtenido de la cola del epidídimo en diversas especies, espermatozoides viables desde varias horas hasta pocos días después de muerto el animal (Hishinuma

et al., 2003; Martínez *et al.*, 2005; Santiago *et al.*, 2004; Yu y Leibo, 2002). Esta capacidad que algunas células y tejidos poseen de permanecer viviendo en forma autónoma, por algún tiempo, luego de la muerte somática o aún después de haber sido aislados del cuerpo, se debe a que los distintos tipos de células presentan diferente resistencia al daño producido por la falta de O₂, considerando desde algunos minutos a varias horas de anoxia. Luego del cese de las funciones vitales se inician los cambios autolíticos en todo el organismo al mismo tiempo, la autólisis es el conjunto de procesos anaeróbicos que tienen lugar en el interior de la célula por acción de enzimas celulares sin intervención bacteriana. Es el más precoz de los procesos transformativos cadavéricos, siendo sucedido posteriormente por la putrefacción. Sin embargo, en algunos sitios la autólisis *postmortem* se manifiesta con mayor rapidez y en otros más lentamente, los tejidos que poseen células con altos contenidos de enzimas hidrolíticas, como por ejemplo, las células pancreáticas, hepatocitos, renales, gastrointestinales, etc. sufren autólisis en forma más rápida que las células con bajos contenidos enzimáticos como por ejemplo, los espermatozoides. Por esta razón el proceso de autólisis es mayor o más rápido en algunas partes del cuerpo que en otras, debido a esto los fenómenos autolíticos y putrefactivos generalmente se superponen en su evolución. Por otra parte, además de los factores endógenos, existen factores exógenos que influyen sobre el grado de desarrollo de la autólisis *postmortem*, como son el tamaño del animal, la condición corporal, la especie (si es de pelo corto, largo, con plumas, etc.), la temperatura ambiente y la humedad (Jaramillo, 1993).

6.1 Depleción de ATP

La lesión hipóxica está asociada con la depleción de ATP y la síntesis disminuida de ATP (Fig. 9), ya que se requiere fosfato de alta energía en forma de ATP para muchos procesos sintéticos y degradativos en la célula. Éstos incluyen el transporte de membrana, la síntesis de proteínas, la lipogénesis y las reacciones de desacetilación-reacetilación necesarias para el ciclo fosfolipídico. El ATP se produce de dos maneras: la vía más importante en las células del mamífero es la fosforilación oxidativa del adenosindifosfato, en una reacción que da lugar a la reducción del oxígeno mediante el sistema de transferencia de electrones en las mitocondrias; la segunda es la vía glucolítica, que puede producir ATP en ausencia de oxígeno utilizando glucosa derivada de los líquidos corporales o de la hidrólisis de glucógeno. Así, los tejidos con mayor capacidad glucolítica (p. ej., hígado) están en ventaja cuando disminuyen los niveles de ATP por la inhibición del metabolismo oxidativo por la lesión. La depleción del ATP a menos del 5 al 10% de los niveles normales tiene efectos amplios sobre muchos sistemas celulares críticos (Robbins y Cotran, 2007):

- 1) La actividad de la bomba de sodio de la membrana plasmática dependiente de energía (ATPasa- Na^+ K^+ sensible a ouabaina) está reducida (Fig. 9). La insuficiencia de este sistema de transporte activo, debido a la concentración disminuida de ATP y aumento de la actividad ATPasa, da lugar a la acumulación intracelular de sodio y a que el potasio salga de la célula. La ganancia neta de solutos se acompaña por ganancia isosmótica de agua, produciendo tumefacción celular y dilatación del retículo endoplásmico (Robbins y Cotran, 2007).

- 2) El metabolismo energético celular está alterado (Fig. 9). Si el suministro de oxígeno a las células se reduce, como ocurre en la hipoxia, la fosforilación oxidativa cesa y las células dependen de la glucólisis para la producción de energía. Este cambio al metabolismo anaeróbico está controlado por metabolitos de la vía de energía que actúan sobre enzimas glucolíticas. La disminución en ATP celular y el aumento asociado en adenosin monofosfato estimulan las actividades de fosfofructocinasa y fosforilasa. Esto da lugar a una tasa aumentada de glucólisis anaeróbica diseñada para mantener la fuente de energía celular mediante la generación de ATP por el metabolismo de la glucosa derivada del glucógeno. Como consecuencia, los almacenes de glucógeno se agotan rápidamente. La glucólisis tiene como resultado la acumulación de ácido láctico y fosfatos inorgánicos de la hidrólisis de los ésteres de fosfato. Esto reduce el pH intracelular dando lugar a disminución de la actividad de muchas enzimas celulares (Robbins y Cotran, 2007).
- 3) El fallo de la bomba de Ca^{2+} da lugar a entrada de Ca^{2+} , con efectos lesivos sobre numerosos componentes celulares (Robbins y Cotran, 2007).
- 4) Con la depleción prolongada o empeorada de ATP ocurre una alteración estructural del aparato sintético de proteínas, manifestada como un desprendimiento de ribosomas del retículo endoplásmico rugoso y una disociación de polisomas a monosomas, con una reducción consecuente en la síntesis proteínica. Al final, hay un daño irreversible en las mitocondrias y las membranas lisosomales y la célula sufre autólisis (Robbins y Cotran, 2007).

5) En las células privadas de oxígeno o glucosa, las proteínas pueden plegarse erróneamente y estas proteínas mal plegadas desencadenan una reacción celular denominada respuesta de la proteína desplegada que puede dar lugar a lesión celular e incluso muerte. El plegamiento defectuoso de la proteína también se ve en las células expuestas a estrés, como calor, y cuando las proteínas se dañan por enzimas (tales como enzimas que responden a Ca^{2+}) y radicales libres (Robbins y Cotran, 2007).

Aunque no todos estos eventos ocurren en el espermatozoide debido a la pérdida de organelos celulares ocurrida durante la espermiogénesis, sí se presentan en las células del epidídimo donde se encuentran almacenados, generándose radicales libres que dañan las membranas del espermatozoide.

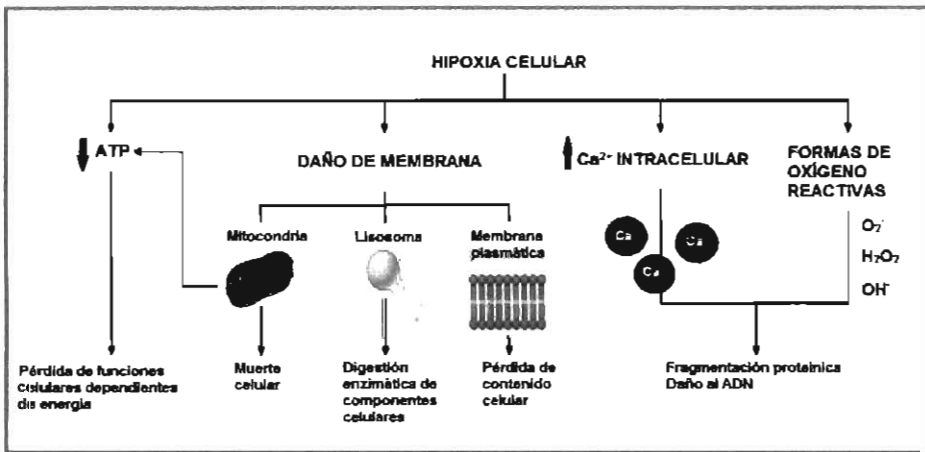


Fig. 8 Sitios celulares y bioquímicos de daño en la hipoxia celular (adaptado de Robbins y Cotran, 2007)

6.2 Daño mitocondrial

Frecuentemente, el daño celular se acompaña de cambios morfológicos en las mitocondrias. Las mitocondrias pueden lesionarse por aumentos del Ca^{2+} citosólico, por estrés oxidativo, por degradación de fosfolípidos a través de las vías de fosfolipasa A_2 y esfingomielina y por productos de la degradación de los lípidos derivados de aquí, tales como ácidos grasos libres y ceramida. A menudo, el daño mitocondrial da lugar a la formación de canal de alta conductibilidad, lo que se ha llamado transición a la permeabilidad mitocondrial, en la membrana interna de la mitocondria. Aunque es reversible en los primeros estadios, este poro no selectivo se hace permanente si persiste el estímulo desencadenante, impidiendo el mantenimiento de la fuerza protónica mitocondrial, o potencial. Dado que el mantenimiento del potencial de membrana es crítico para la fosforilación oxidativa mitocondrial, se desprende que la transición a la permeabilidad mitocondrial irreversible es un golpe mortal para la célula. El daño mitocondrial también puede asociarse con salida del citocromo c al citosol (Robbins y Cotran, 2007).

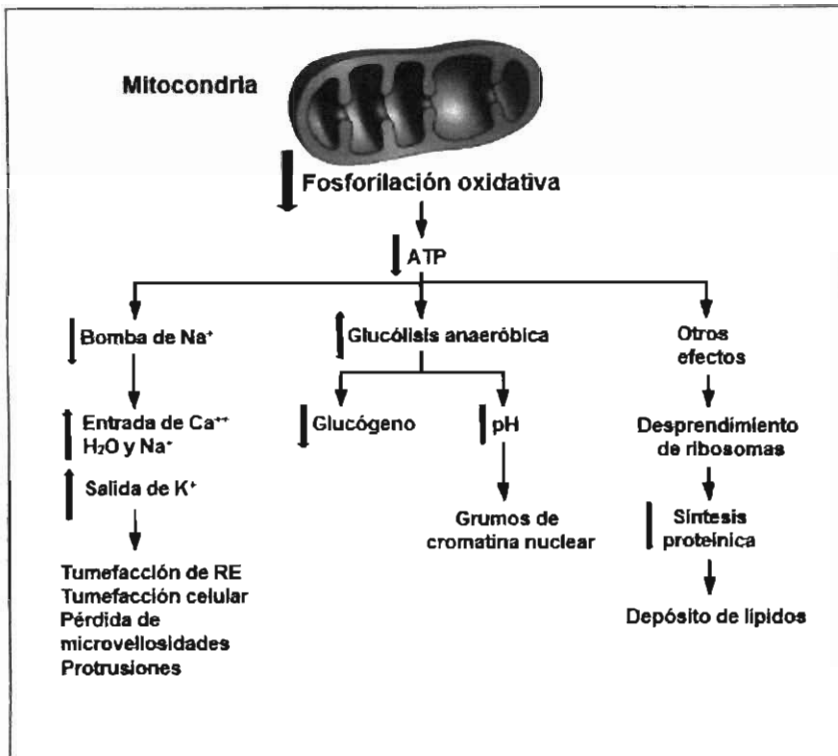


Fig. 9 Consecuencias funcionales y morfológicas de la disminución intracelular de ATP durante la hipoxia celular (Robbins y Cotran, 2007)

6.3 Aflujo de Calcio intracelular y pérdida de la homeostasia del Calcio

Los iones de calcio son mediadores importantes de la lesión celular (Trump y Berezsky, 1998). El calcio citosólico libre se mantiene a concentraciones extremadamente bajas (siendo menor de 0,1 μmol) en comparación con los niveles extracelulares de 1,3 mmol, la mayoría del calcio intracelular está secuestrado en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico. Tales gradientes están modulados por ATPasas- Mg^{2+} , Ca^{2+} , dependientes de energía, asociadas a la membrana. La hipoxia

celular y ciertas toxinas producen un aumento precoz en la concentración citosólica de calcio, debido al aflujo neto de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y la liberación de Ca^{2+} de las mitocondrias y del retículo endoplásmico (Fig. 10). Los aumentos mantenidos subsiguientes de Ca^{2+} intracelular derivan de aumentos inespecíficos en la permeabilidad de membrana. A su vez, el aumento de Ca^{2+} activa varias enzimas, con efectos celulares potencialmente deletéreos. Las enzimas que se sabe que se activan por el calcio incluyen ATPasas, que por lo tanto aceleran la depleción del ATP, fosfolipasas que producen lesión en la membrana, proteasas que rompen las proteínas de membrana y citoesqueléticas, y endonucleasas que son responsables de la fragmentación del ADN y la cromatina (Fig. 10). Los niveles aumentados de Ca^{2+} intracelular también dan lugar a un aumento de la permeabilidad mitocondrial (Paschen, 2000). Aunque la lesión celular a menudo origina un aumento de calcio intracelular y, a su vez, esto media varios efectos deletéreos, incluyendo muerte celular, la pérdida de la homeostasia de calcio no siempre es un episodio proximal en la lesión celular irreversible (Robbins y Cotran, 2007).

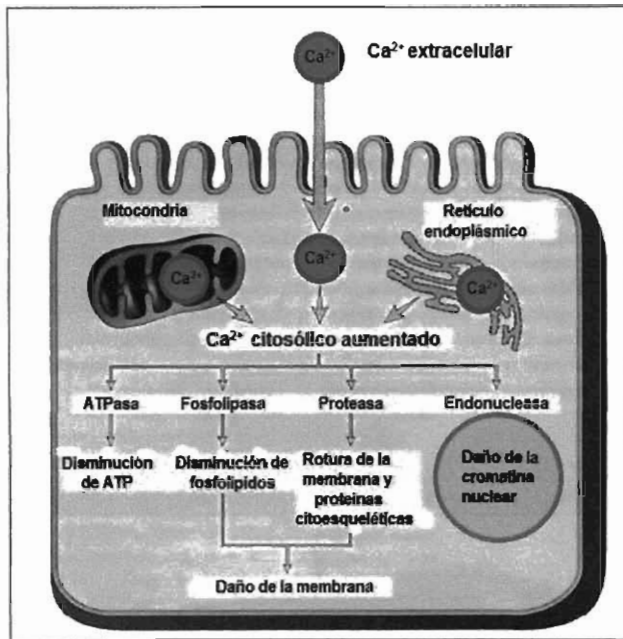


Fig. 10 Fuentes y consecuencias del aumento de calcio citosólico en la hipoxia celular (adaptado de Robbins y Cotran, 2007)

6.4 Acumulación de radicales libres derivados de oxígeno (estrés oxidativo)

Las células generan energía reduciendo el oxígeno molecular a agua. Durante este proceso se producen pequeñas cantidades de formas reactivas de oxígeno parcialmente reducidas como un subproducto inevitable de la respiración mitocondrial. Algunas de estas formas son radicales libres que pueden dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las células tienen sistemas de defensa para prevenir la lesión causada por estos productos. Un desequilibrio entre los sistemas generadores y limpiadores de radicales libres da lugar a *estrés oxidativo*, una situación que se ha asociado con la hipoxia celular (Droge, 2002). Los efectos de

estas especies reactivas son de un rango amplio, pero tres reacciones son particularmente relevantes en la hipoxia celular:

Peroxidación lipídica de membranas. Los radicales libres en presencia de oxígeno pueden producir peroxidación de lípidos dentro del plasma y de las membranas de los organelos. El daño oxidativo se inicia cuando los enlaces dobles de los ácidos grasos insaturados de los lípidos de la membrana son atacados por radicales libres derivados del oxígeno, particularmente por OH[•]. Las interacciones lípido-radical libre dan lugar a peróxidos, que a su vez son inestables y reactivos, y se siguen de una reacción en cadena autocatalítica (denominada *propagación*), que puede dar lugar a un daño extenso en la membrana, organelos y en la célula. Otras opciones de terminación más favorables tienen lugar cuando el radical libre se captura por un limpiador tal como la vitamina E, ensamblada en la membrana celular (Robbins y Cotran, 2007).

Modificación oxidativa de proteínas. Los radicales libres favorecen la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácido, formación de enlaces cruzados proteína-proteína (p. ej., enlaces disulfuro), y oxidación del esqueleto proteínico, dando lugar a la fragmentación proteínica. La modificación oxidativa potencia la degradación de proteínas críticas mediante el complejo multicatalítico proteosomal, causando estragos en la célula (Robbins y Cotran, 2007).

Lesiones en el ADN. Las reacciones con la timina en el ADN nuclear y mitocondrial producen rupturas de una cadena del ADN (Robbins y Cotran, 2007).

7. ENSAYO DE ELECTROFORESIS ALCALINA DE CÉLULAS INDIVIDUALES (ENSAYO COMETA)

El ensayo de electroforesis de células individuales fue desarrollado por Östling y Johanson en 1984, posteriormente Singh *et al.* (1988) modificaron la técnica haciéndola capaz de medir niveles bajos de rupturas en el ADN con una gran sensibilidad. Olive (1989), utilizó la palabra "cometa" del campo de la astronomía para bautizar el ensayo debido a la morfología que muestran las células con su ADN dañado. Este ensayo ha tenido un gran impacto en numerosas áreas del conocimiento científico, especialmente en bioquímica, genética y biología molecular (Piperakis, 2009). El tipo de daño al ADN más simple detectado con este ensayo son las fracturas de cadena doble (DSB), que pueden ser revelados sometiendo la muestra a movilidad en una electroforesis a pH neutro, las fracturas de cadena simples (SSB) no producen fragmentos de ADN a menos que exista una desnaturalización de las hebras, lo que se logra sometiendo el material a condiciones alcalinas con un pH superior a 12, con la versión alcalina además de DSB y SSB se pueden detectar sitios sensibles al álcali que se originan durante la reparación por escisión de bases y nucleótidos (Tice, 1995). Así es como se consolidan dos versiones diferentes del ensayo: Singh *et al.* (1988) que describe la versión alcalina y Olive (1989) que describe la versión neutra.

En esta técnica los espermatozoides se incluyen en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y se someten a soluciones lisantes para extraer las membranas y las proteínas. Se obtienen así nucleoides, es decir, núcleos desproteinizados, en los que los bucles de ADN se han relajado por la descompactación. Al someter al ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino o neutro, los fragmentos negativamente

cargados de ADN o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo para formar un halo (Collins, 2004) apreciándose una estructura parecida a la de un cometa al teñir el ADN luego de la electroforesis (Olive, 1989).

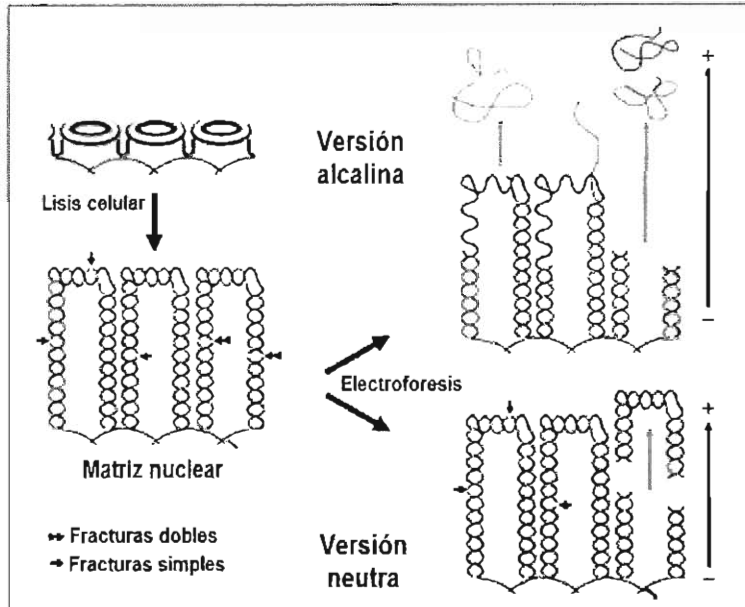


Fig. 11 Versiones neutra y alcalina del Ensayo Cometa (adaptado de Shaman y Ward, 2006)

7.1 Medición del daño en el ADN

Generalmente se utilizan 3 parámetros de medición: largo de la cola del cometa (tail length), el momento de la cola (tail moment) y el porcentaje de ADN en la cola (% tail DNA). La medición del largo de la cola y el momento están dados en unidades arbitrarias que pueden variar entre estudios o entre laboratorios. El largo de la cola es considerada una medida insatisfactoria porque el largo es sensible a la intensidad del sistema de análisis de imagen, lo que afecta el criterio para determinar el

final de la cola (Collins, 2004). El momento de la cola, índice que se refiere a la migración del ADN y a la cantidad relativa de material genético en la cola, es el producto del largo de la cola y el porcentaje de ADN en la cola. El porcentaje de ADN en la cola es una medida que indica la intensidad de fluorescencia relativa en la cabeza y la cola (Collins, 2004), está limitado por un máximo de 100 y un mínimo de 0, no existiendo variabilidad en los extremos, por lo que tiene la ventaja de que puede ser estandarizado, a diferencia de la longitud de la cola y el momento de la cola, que aunque son consistentes en un estudio, no pueden ser comparados con otros estudios, por lo que se está enfatizando el uso del porcentaje de ADN en la cola como la medida métrica adecuada en el ensayo cometa (Kumaravel y Jha, 2006). Hartmann *et al.* (2003), después de describir varios parámetros, sugieren que es mucho más recomendable el uso del porcentaje de ADN en la cola, ya que está linealmente relacionado con el daño en el material genético y con la frecuencia de fragmentos de ADN. Collins (2004) comenta que el porcentaje de ADN en la cola es la medida más conveniente porque abarca una amplia gama de daño (de 0 a 100%), es independiente de la configuración de umbral de los programas de análisis de imágenes y da alguna impresión del porqué el cometa presenta ese patrón visual.

7.2 Otras metodologías para evaluar la integridad del ADN

Otras metodologías para evaluar la integridad de la cromatina/ ADN de los espermatozoides son el etiquetado de rupturas del ADN *in situ* introduciendo nucleótidos marcados en las mismas utilizando enzimas como la transferasa terminal (TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling) o la ADN polimerasa (in situ nick translation ISNT) (Gorczyca *et al.*,

1993). Estas metodologías se basan en el empleo de enzimas sobre los espermatozoides fijados en portaobjetos, su eficacia no es muy alta, resultando sólo marcadas aquellas rupturas accesibles a la enzima, lo cual se traduce en una reproducibilidad relativamente baja de los resultados. Además, los reactivos son caros, por lo que estas técnicas sólo se aplican en estudios de investigación, no siendo posible utilizarlas para la valoración clínica del semen. La técnica de referencia actual para el estudio de la fragmentación del ADN de los espermatozoides es el ensayo de estructura de la cromatina de Evenson (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay; Evenson *et al.*, 1980; Evenson *et al.*, 1999; Evenson y Jost, 1994); en esta técnica, los espermatozoides en suspensión se someten a una solución desnaturizante ácida. Aquellos espermatozoides sin rupturas en su ADN son resistentes a dicha desnaturización, permaneciendo como ADN de cadena doble. Sin embargo, los espermatozoides con ADN fragmentado sí desnaturizan su ADN, transformándose en ADN de cadena sencilla. Posteriormente se tiñen con naranja de acridina. Este colorante emite fluorescencia verde cuando se une al ADN de cadena doble, mientras que en los espermatozoides con ADN desnaturizado, en cadena simple, este fluorocromo emite fluorescencia roja. Los espermatozoides con ADN fragmentado se cuantifican usando un citómetro de flujo, para discriminar ambos tipos de fluorescencia. El SCSA es una técnica con gran proyección clínica, habiendo sido evaluada en muestras de pacientes (Evenson *et al.*, 1999). La técnica SCSA, aunque robusta y altamente reproducible, es un sistema muy caro, difícil de implementar y poco accesible para el laboratorio básico (De Jonge, 2002).

Ensayo	Tipo de daño detectado	Proteínas removidas
TUNEL	Dobles y simples fracturas accesibles	Ninguna
<i>In situ</i> translational	Simple fracturas accesibles	Ninguna o pocas
SCSA	Dobles y simples fracturas que no estén en toroides. Dobles y simples fracturas externas en toroides?	Algunas histonas Algunas protaminas externas?
Cometa neutro	Fracturas dobles	Todas (histonas y protaminas)
Cometa alcalino	Fracturas dobles y simples	Todas (histonas y protaminas)

Tabla 4. Tipo de daño detectado en el ADN espermático y las proteínas que son removidas según el tipo de estudio de la cromatina espermática (Shaman y Ward, 2006).

V. JUSTIFICACIÓN

La reproducción es un fenómeno esencial para la supervivencia de las especies y, por tanto, la biología y la tecnología de la reproducción tienen un papel esencial en la conservación de la biodiversidad. Las técnicas reproductivas se han usado desde hace muchos años en animales domésticos y en seres humanos, sin embargo, es generalmente difícil extrapolar de una especie a otra cuando se trata de aplicar tecnologías reproductivas (Wildt *et al.*, 2001). A pesar de esto, se ha utilizado con éxito el principio de los "modelos animales" con el fin de usar especies conocidas de animales domésticos como punto de partida en el desarrollo de tecnologías reproductivas de especies silvestres (Wildt, 1992; Wildt, 1995). Una de estas técnicas es la obtención de

espermatozoides a partir de animales muertos ya que pueden recuperarse espermatozoides viables de la cola del epidídimo hasta varias horas (o pocos días) después de la muerte (Garde *et al.*, 1995). Este procedimiento tiene grandes ventajas cuando se trata de conservar material genético de especies amenazadas por diversas causas (pérdida de hábitat, caza indiscriminada, etc.) también puede ser de gran utilidad para disponer de germoplasma de especies de las que se obtienen muestras como resultado de actividad cinegética. Esta posibilidad de preservación permite el intercambio de material genético entre individuos que estén muy alejados geográficamente, siendo este hecho de especial interés para disminuir la consanguinidad en poblaciones fragmentadas de especies en peligro de extinción (Gomendio, 2003). Sin embargo, la obtención de estas células implica el problema de la autólisis que sufren al morir el animal, y el consecuente daño al ADN. Actualmente los análisis seminales rutinarios que se centran en la determinación de la concentración, motilidad y morfología espermática, no son capaces de detectar daños sutiles en la estructura de la cromatina espermática (Ballachey *et al.* 1987), por otra parte se sabe que la integridad del genoma paterno es esencial para asegurar la transmisión precisa y fidedigna de la información genética a la descendencia (Evenson *et al.*, 2002). Durante los últimos años se ha reconocido que el daño del ADN en los espermatozoides puede ser la explicación de un elevado porcentaje de casos idiopáticos (Evenson *et al.*, 1999; Larson *et al.*, 2003), de tal modo que el estudio de la fragmentación del ADN de los espermatozoides es un tema de investigación activa, con publicaciones continuas en las revistas especializadas (Evenson *et al.*, 2002; Irvine *et al.*, 2000; Duran *et al.*, 2002; Carrell *et al.*, 2003; Benchaib *et al.*, 2005; Larson *et al.*, 2003; Loft *et al.*, 2003; Bungum *et al.*, 2007; Tesarik *et al.*, 2004; Sakkas *et al.*, 2001; Zini *et al.*, 2001). Estos estudios indican que

los espermatozoides con ADN defectuoso pueden tener una morfología, motilidad y capacidad de fecundación normal, pero no dar gestaciones viables. Algunos autores han indicado que los espermatozoides con daño nuclear mantienen su habilidad para fecundar los ovocitos en metafase II (Ahmadi y Ng, 1999b). Sin embargo, la presencia en el embrión de modificaciones a nivel de nucleótidos procedentes del complemento genómico paterno que no hayan sido reparadas por el ovocito, pueden ser incompatibles con el desarrollo embrionario y fetal normal (Aitken y Baker, 2006); es por ello que la valoración de la integridad del ADN en espermatozoides que sufren el proceso de autólisis *postmortem* podría aportar información adicional acerca de la calidad del espermatozoide pudiendo ayudar a seleccionar los espermatozoides intactos o con un bajo nivel de daño nuclear, siendo de gran valor pronóstico en la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistida.

VI. HIPÓTESIS

Existe una correlación positiva entre el tiempo *postmortem* y el porcentaje de fragmentación en el ADN del espermatozoide.

VII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tiempo *postmortem* sobre el ADN de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de ovino.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la correlación del tiempo *postmortem* (4, 24 48, 72, 96 y 120 hrs.) y el porcentaje de fragmentación del ADN en espermatozoides.

- 2) Analizar la correlación del porcentaje de fragmentación del ADN con los parámetros convencionales del espermiograma.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

Se examinaron las muestras de 60 pares de testículos de ovinos, que se obtuvieron en el Rastro Municipal de Texcoco, éstos se transportaron a 4 °C en solución salina fisiológica. Se realizó la disección del conducto deferente y de la cola del epidídimo para obtener espermatozoides mediante lavado retrógrado epididimal de un testículo de cada par a las 4 h *postmortem* (n = 60). El testículo restante de cada par se asignó aleatoriamente a uno de los siguientes tiempos *postmortem*: 24, 48, 72, 96 y 120 h para someterse al mismo procedimiento (n = 12 para cada tiempo *postmortem*). Se analizó la misma cantidad de testículos izquierdo y derecho, para cada tiempo *postmortem*. De cada muestra se realizó un espermiograma clásico y el análisis de fragmentación del ADN. El método que se utilizó para el análisis de ADN es el Ensayo de Electroforesis Alcalina de Células Individuales descrito por Singh *et al.* (1988).

Reactivos

Ácido cítrico, Fructosa, Agarosa, Sarcosinato de sodio, Cloruro de sodio (NaCl), Acido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA), Tris (tris-(hidroxi-metil) aminometano), hidróxido de sodio (NaOH) y dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co St. Louis, Missouri, USA); Tritón X-100 (BIO-RAD Laboratorios CA, USA).

Recolección y transporte de las muestras

Inmediatamente después de la muerte del animal, se disecaron ambos testículos, ligando el paquete vascular y el conducto epididimario con hilo de algodón. Cada testículo se limpió con toallas de papel y se colocó dentro de bolsas plásticas selladas con 20 ml de solución salina

fisiológica e identificadas con el número correspondiente al orden en que fueron recolectados indicando la lateralidad del testículo, además de la fecha y hora exactas de la recolección. El transporte de los testículos demoró entre 60 y 90 minutos. El tiempo transcurrido desde la recolección de los testículos en el rastro, hasta el procesamiento de ellos en el laboratorio, tomó 4 horas. Cada testículo se pesó con una balanza analítica Ohauz explorer y se midió su diámetro con un Vernier.

Lavado retrógrado epididimal

El material seminal se extrajo según la técnica descrita por Amann *et al.* (1982), realizando un lavado retrógrado de la porción caudal del epidídimo, desde el conducto deferente, inyectando medio Andersen (1975).

Para realizar el lavado epididimario por flujo retrógrado se siguieron los siguientes pasos y en cada caso se anotó la hora de inicio de la recolección de espermatozoides del epidídimo:

1. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se disecaron mediante el uso de implementos y técnicas asépticas. Se removió la túnica serosa testicular y los vasos sanguíneos con un bisturi con hojilla N° 10 y tijera recta.
2. Se localizó el *septum* (indentación) del epidídimo, correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se hizo un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del epidídimo se reduce para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.

4. Se colocó una aguja calibre 20 ó 21 dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptó una jeringa (tipo "air-tite" de 5 ml) conteniendo 3 ml de medio Andersen y se perfundió lentamente dentro del lumen del vaso deferente.

5. A medida que se perfundió el vaso deferente con el medio de lavado, se observó un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, apareció en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario, representado por un líquido espeso e inodoro y de un color crema pálido o blanco cremoso.

Espermograma clásico (volumen, viabilidad, concentración, movilidad masal, movilidad progresiva y morfoanormalidades).

Determinación del **volumen**. Se determinó mediante una micropipeta marca Eppendorf.

Para estimar la **viabilidad** se utilizó la técnica de tinción supravital descrita por Eliasson y Treichl (1971). Se tomaron 4µl de muestra directa que se colocaron en un portaobjetos, a la muestra se le agregaron 4µl de eosina y 2µl de nigrosina, se dejó secar a temperatura ambiente y se evaluó al microscopio (Olympus CH30 USA) con objetivo 40x, para establecer el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. En esta técnica la eosina penetra el espermatozoide cuando la permeabilidad de la membrana pierde su continuidad por lo tanto se dice que el espermatozoide está muerto, mientras que los espermatozoides vivos se distinguen transparentes sobre un fondo oscuro dado por la nigrosina.

La determinación de la **concentración** espermática se realizó por conteo en cámara de Neubauer (hemocitometría) previa dilución de la muestra seminal con agua destilada en pipeta para glóbulos blancos Blaubrand de 1 ml de capacidad. . El número de células se determinó mediante el uso de la fórmula siguiente: Factor de dilución x número de células contadas x 10 000 x 5 (Vidament *et al.*, 2000):

Factor de Dilución = 1: 25

No. de células = Contadas por 5 cuadrantes de la cámara

10 000 = Dado por la dimensión de la cámara

5 = Número de cuadrantes contabilizados

Para la valoración de la **movilidad masal**, se tomó una muestra de 10µl que se depositó sobre un portaobjetos atemperado observándose en microscopio óptico (OLYMPUS CH30 USA) de campo claro (20x), provisto de platina termostabilizadora. La valoración de la movilidad masal, se realizó según la clasificación efectuada por Evans y Maxwell (1990), estableciendo una categoría de 0 a 5 puntos (Tabla 5), según la calidad y vigor de las ondas que produce la masa espermática en movimiento.

Grado	Clave	Descripción
0	Muertos	Todos los espermatozoides inmóviles
1	Muy pobre	Muy pocos espermatozoides (alrededor del 10%) muestran movimiento estacionario
2	Pobre	No se forman ondas pero alrededor de 20-40% de los espermatozoides se mueven
3	Regular	Bajo movimiento de ondas con 45-65% de células espermáticas activas

4	Bueno	Movimiento vigoroso se pueden ver ondas o remolinos no muy rápidos con un 70-85% de espermatozoides activos
5	Muy bueno	Denso, con ondas y remolinos moviéndose rápidamente, más del 90% de los espermatozoides se mueven

Tabla 5. Clasificación de la movilidad masal (Evans y Maxwell, 1990).

Movilidad progresiva: la determinación se realizó mediante la estimación visual microscópica (40x) de 100 espermatozoides para obtener el porcentaje (0-100%) de células móviles en una muestra de 10µl (Evans y Maxwell, 1990).

Grado	Clave	Descripción
0	Muertos	Todos los espermatozoides inmóviles
1	Muy pobre	Los espermatozoides giran sobre si mismos
2	Pobre	El movimiento es anormal con movimientos progresivos eventuales
3	Regular	El movimiento es progresivo lento y sinuoso
4	Bueno	Los espermatozoides tienen movimientos progresivos rápidos
5	Muy bueno	Las células espermáticas presentan movimientos progresivos muy rápidos

Tabla 6. Clasificación de la movilidad progresiva (Evans y Maxwell, 1990).

La **morfología** espermática se cuantificó tras realizar el análisis de 100 espermatozoides en cada una de las muestras; el resultado se expresó como porcentaje (Ott *et al.*, 1987).

Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales

El ensayo cometa consiste en incluir las células en agarosa de bajo punto de fusión sobre un portaobjetos, la primera capa se preparó con 150 µL de agarosa al 1% (NMA), la segunda capa contenía las células

embebidas en 75 μ L de agarosa al 0.65% (LMA) y la tercer capa estuvo formada por 75 μ L de agarosa al 0.65% (LMA) para formar un microgel, después de solidificarse se sometió a lisis en una solución de sarcosinato de sodio al 1%, NaCl 2.5 M, EDTA disódico 100 mM, Tris 10 mM (ajustado a pH 10), DMSO al 10% y Tritón X -100 al 1%, por 1 hora para remover todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalinas. Las laminillas posteriormente se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se cubrieron con un buffer alcalino que contenía EDTA disódico 1mM, NaOH 300 mM por 60 minutos para posteriormente iniciar la electroforesis por 20 minutos a 25V y 300mA. Después de la electroforesis, las laminillas se lavaron 3 veces con Tris 0.4M (pH 7.5) para remover detergentes y álcali, y se tiñeron con 25 μ l de Bromuro de Etidio en 20 μ l/ml de agua destilada y se les colocó un cubreobjetos (Singh *et al.*, 1988). Las observaciones se hicieron con un microscopio OLYMPUS Evolution VF BX51 equipado con un filtro de excitación de 590nm. Las imágenes de 100 cometas de cada muestra se seleccionaron al azar y fueron observadas con un software analizador de imágenes (Comet Score) proporcionado gratuitamente en Internet por la empresa TriTek-Corporation de USA y recomendado por la Universidad de Stanford, la Universidad de California y el Weizmann Institute of Science de Israel.

Análisis estadístico

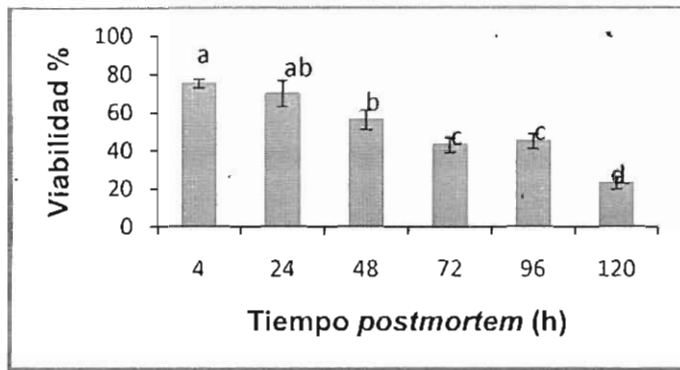
Se utilizó el paquete SAS, 2007 (ProcGLM). Los resultados se analizaron mediante un ANDEVA para un modelo mixto lineal generalizado, con los valores del espermograma (motilidad masal, motilidad progresiva,

viabilidad, concentración espermática y anormalidades) y la fragmentación del ADN como variables dependientes, mientras que la hora de recolección *postmortem*, la lateralidad, el peso y el diámetro testicular se analizaron como variables independientes. Los valores del espermiograma y la fragmentación del ADN a las 4 h se utilizaron como covariables. Se utilizó la prueba de correlación de Pearson para analizar las relaciones entre las diferentes variables. Las diferencias en las variables entre los diferentes tiempos *postmortem* se analizaron por la prueba de comparación de Tukey con un $\alpha \geq 0.05$.

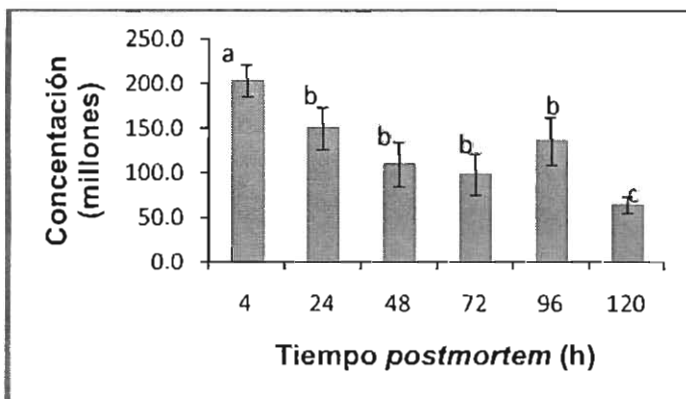
X. RESULTADOS

En general se observó una disminución de la calidad de los espermatozoides conforme aumentaba el tiempo *postmortem*, tanto en los parámetros del espermiograma como en el porcentaje de ADN fragmentado. Además se encontraron correlaciones entre la fragmentación del ADN y la movilidad masal (-0.64167, $p < .0001$), movilidad progresiva (-0.66779, $p < .0001$), viabilidad (-0.58483, $p < .0001$) y anormalidades (0.42825, $p < .0001$).

Los resultados de las características de los espermiogramas y el daño en el ADN realizados a las muestras obtenidas por lavado retrógrado a diferentes tiempos *postmortem* se presentan a continuación.

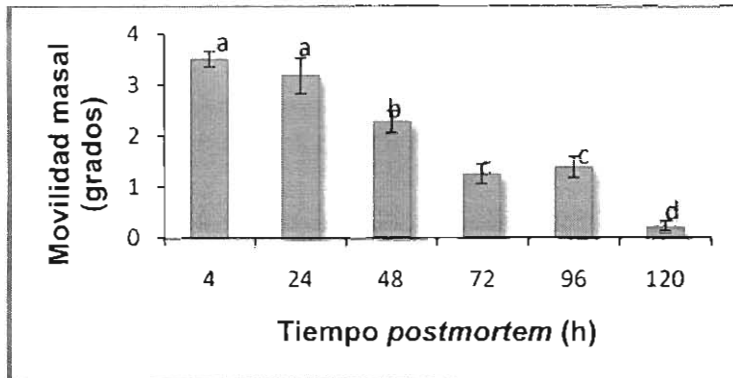


Gráfica 1. Viabilidad en espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo en ovinos a diferentes tiempos *postmortem*. Se observa la viabilidad encontrada a diferentes tiempos *postmortem* en espermatozoides epididimales, se encontraron diferencias significativas a partir de las 24 h con respecto al siguiente tiempo (48 h). A las 96 h *postmortem* se observó un incremento en el porcentaje, sin diferencias significativas con el tiempo anterior (72 h). Las letras a, b, c, d indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

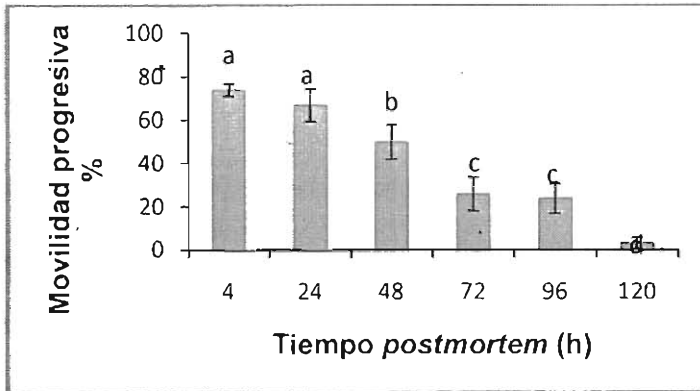


Gráfica 2. Concentración espermática en muestras obtenidas por medio de lavado retrógrado epididimal en ovino a diferentes tiempos *postmortem*. Se observa la concentración (millones) obtenida a diferentes tiempos *postmortem*, las diferencias significativas encontradas

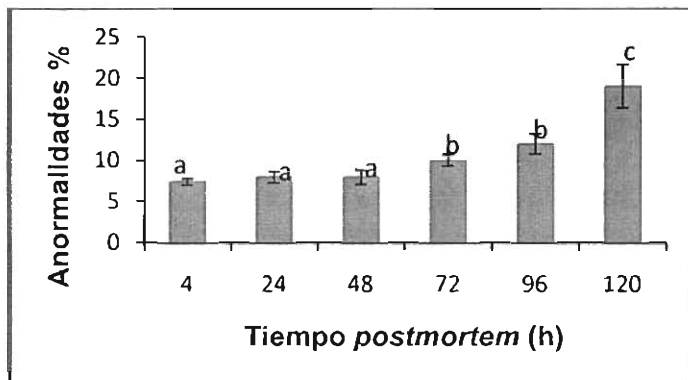
se observan a partir de las 4 h postmortem. A las 96 h se presenta un incremento en el porcentaje, sin embargo, éste no es significativamente diferente al porcentaje del tiempo anterior (72 h). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).



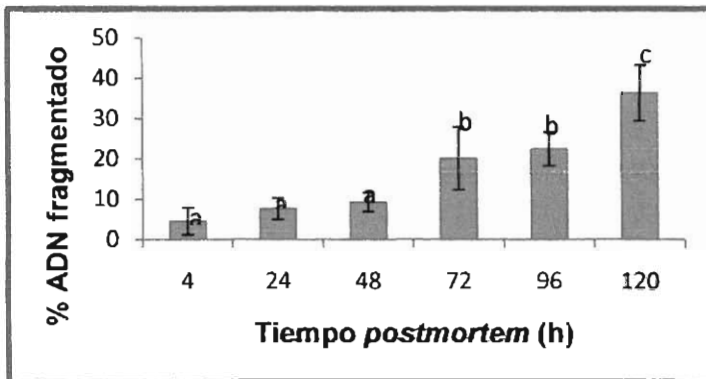
Gráfica 3. Grados de movilidad masal obtenida en las muestras de espermatozoides epididimales de ovino a diferentes tiempos postmortem. Se observan los diferentes grados de movilidad masal (0-5) en los espermatozoides de ovino que se obtuvieron de cola de epidídimo, encontrándose diferencias significativas a partir de las 24 h postmortem. También se observa un incremento a las 96h, no existiendo diferencias significativas con el tiempo anterior (72h). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).



Gráfica 4. Porcentaje de movilidad progresiva espermática en espermatozoides epididimales de ovino a diferentes tiempos *postmortem*. Se observa el porcentaje de movilidad progresiva de los espermatozoides epididimales en ovino a diferentes tiempos *postmortem*, resalta el hecho de no encontrarse diferencias significativas hasta las 48 h *postmortem*. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).



Gráfica 5. Porcentaje de anomalías encontradas a diferentes tiempos *postmortem* en espermatozoides de cola de epididimo de ovino. Se observa el porcentaje de anomalías morfológicas en el espermatozoide de ovino a diferentes tiempos *postmortem*, las diferencias significativas se presentaron a partir de las 48 h *postmortem*. El porcentaje de anomalías aumenta conforme el tiempo *postmortem* transcurre. Las letras a, b, c, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).



Gráfica 6. Porcentaje de ADN en la cola del cometa a diferentes tiempos *postmortem* en espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de ovino mediante lavado retrógrado. Se muestra el porcentaje de fragmentación de ADN a diferentes tiempos *postmortem* en los espermatozoides de cola de epidídimo de ovino, los cambios significativos se presentan a partir de las 48 h *postmortem*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).



Fig. 12 Imágenes de cometas obtenidos de espermatozoides. a, b, y c) cometas mostrando una pequeña migración que corresponde al daño basal. d) cometa típico en que se puede apreciar cabeza y cola.

También encontramos diferencias significativas ($p < 0.0001$) en cuanto al peso del epidídimo, la concentración, la movilidad masal, la movilidad progresiva, la viabilidad, anomalías espermáticas y el porcentaje de fragmentación de ADN durante el tiempo en que se realizó este estudio (Agosto-Marzo). Sin embargo, no se encontraron diferencias sobre ninguno de los parámetros en cuanto a la lateralidad del testículo (derecho o izquierdo).

XI. DISCUSIÓN

La biodiversidad está disminuyendo a un ritmo considerable y es un hecho que numerosas especies se encuentran en alguna categoría de riesgo (IUCN, 2011), las causas pueden ser desde la destrucción o fragmentación del hábitat (Hell *et al.*, 2005), introducción intencional ó no intencional de especies exóticas en los ecosistemas (Pitra y Lutz, 2005; Cirovic, 2006), caza indiscriminada y explotación (Alonso *et al.*, 2009), intoxicación por contaminantes (Potts, 2005), enfermedades (Hartley, 2005), hibridación artificial (Lieckfeldt *et al.*, 2006), calentamiento global (Sanz-Elorza *et al.*, 2003) y disminución de recursos (Said *et al.*, 2005). Para prevenir la extinción inminente de especies se han propuesto dos acciones principales, la protección del hábitat y la creación de bancos genéticos (Gilmore *et al.*, 1998) para la conservación de gametos y embriones que mantengan la diversidad genética. En los mamíferos, la conservación de gametos es combinada con técnicas de reproducción asistida, sin embargo los bancos genéticos son efectivos solamente para especies de las cuales su fisiología reproductiva está bien caracterizada, como en el caso de especies domésticas como el perro (Zindl *et al.*, 2006), el bovino y el caballo (Alm *et al.*, 2001; Blottner *et al.*, 2001). A pesar de esto, se ha utilizado con éxito el principio de los “modelos animales” con el fin de usar especies conocidas de animales domésticos como punto de partida en el desarrollo de tecnologías reproductivas de especies silvestres (Wildt, 1992; Wildt, 1995). Una de estas técnicas es la obtención de espermatozoides epididimales potencialmente fértiles, almacenados en la cola del epididimo, luego de la muerte o castración por motivos médicos (Shakeri *et al.*, 2008). Se han realizado diversos estudios sobre la obtención *postmortem* de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo: Martínez (2005) y Garde *et al.* (1998), en *Cervus*

elaphus hispanicus; Saragusty *et al.* (2006) en *Gazella gazella* y *Gazella dorcas*; Santiago *et al.* (2004) en *Capra pyrenaica hispanica*, y nuestro trabajo muestra que es posible obtener espermatozoides viables de cola de epididimo de ovino mantenido en refrigeración hasta 48 horas después de la muerte del animal, tiempo en que los espermatozoides se encuentran dentro del intervalo normal establecido por Boretto *et al.*, (2002): motilidad masal 2.9 y viabilidad 60%, rangos con los que obtuvieron 59% de hembras preñadas por medio de inseminación artificial, por otra parte, Paulenz *et al.* (2007) proponen parámetros mínimos de movilidad progresiva $\geq 75\%$ y morfología normal de 90%, obteniendo un porcentaje de preñez de 62.5%, ligeramente más alto que el obtenido por Boretto *et al.* (2002). Por otra parte, diversos investigadores que han trabajado con especies diferentes: Hishinuma *et al.* (2003), con ciervo; Yu y Leibo (2002) en perro y Zomborszky *et al.* (1999) con ciervo rojo, mencionan que los parámetros de la movilidad masal y progresiva se alteran con el transcurso del tiempo *postmortem*. Kaabi *et al.* (2003) en espermatozoides de carnero obtenidos *postmortem*, reportaron que a las 24 h el porcentaje de movilidad progresiva fue de 64.7 ± 2.7 y a las 48 h fue de 52.4 ± 3.8 , encontrando diferencias significativas a las 24 h, en nuestro estudio los valores obtenidos fueron semejantes (a las 24 h 67 ± 7.4 y a las 48 h 50 ± 7.8), sin embargo, encontramos diferencias significativas hasta las 48 h *postmortem* con respecto al siguiente tiempo de 72 h, esto pudiera deberse al medio utilizado para el lavado retrógrado epididimal (medio Andersen), el cual, al contener fructosa, le proporciona una fuente de energía al espermatozoide, mientras que Kaabi *et al.* (2003) no utilizaron medio alguno para la obtención de la muestra (obtenida mediante cortes con bisturí en la cola del epididimo), por lo que atribuimos a la falta de un medio energético los valores menores de movilidad obtenidos por Kaabi

et al. (2003). Por otra parte, la evaluación de la integridad de la membrana plasmática constituye una importante información en la evaluación de la fertilidad potencial del macho, González *et al.* (2010) en ovino obtuvieron una viabilidad de 82% a las 24 h y 75% a las 48 h *postmortem*, mientras que nosotros obtuvimos a las 24 h 69.8 ± 7.0 y a las 48 h 56.0 ± 5.0 , estos resultados difieren tal vez por los diferentes medios utilizados para la obtención de la muestra ya que ellos utilizaron medio Brackett, además no mencionan las características de los individuos que analizaron (raza, edad, etc.). Los espermatozoides con daño en la membrana liberan nucleasas endógenas que dañan el ADN (Ward y Ward, 2004). Sotolongo *et al.* (2005) reportaron la existencia de endonucleasas endógenas en espermatozoides maduros de ratón, hámster y humanos, que digieren el ADN espermático en fragmentos de aproximadamente 50 kb.

En cuanto a la morfología espermática, cabe señalar que es un importante parámetro de selección y se correlaciona con el potencial de fertilidad, desarrollo embrionario e implantación (Kruger *et al.*, 1986; Oehninger *et al.*, 1996; De Vos *et al.*, 2003); la morfología espermática es muy importante para la sobrevivencia de los embriones en los ovinos, como lo demostró Fournier-Delpech *et al.* (1982) al obtener un mayor porcentaje de sobrevivencia de embriones resultantes de espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo mientras que la sobrevivencia fue menor en embriones resultantes de espermatozoides de la porción distal del cuerpo del epidídimo, donde se encuentran espermatozoides que aun no han perdido la gota citoplásmica, situación considerada como anomalía morfológica de los espermatozoides. Kaabi *et al.* (1999), en morueco reportaron que el incremento en el tiempo de obtención de las muestras espermáticas aumenta el porcentaje de espermatozoides con defectos morfológicos, de 7.2 ± 3.0

a las 24 h a 11.5 ± 3.6 a las 48 h *postmortem*, manteniendo las muestras en refrigeración (5°C). De igual forma, Kaabi *et al.* (2003), en borrego reportaron un porcentaje de anomalías de 7.2 ± 0.9 a las 24 h y 11.5 ± 4.3 a las 48 h. Nuestros resultados son semejantes ya que se obtuvo un porcentaje de anomalías totales de 8 ± 0.7 a las 24 h y 8 ± 0.86 a las 48 h conservando las muestras a 4°C . La mayoría de las alteraciones encontradas por nosotros conforme el tiempo *postmortem* aumenta, fueron en el flagelo lo que implica un impedimento para el movimiento de los espermatozoides, esto coincide con Kaabi *et al.* (1999) quienes reportaron que entre 65% y 75% de las anomalías (dependiendo del tiempo *postmortem*) se presentaron en el flagelo del espermatozoide ovino. Kaabi *et al.* (1999) también menciona que a temperatura ambiente las anomalías espermáticas en el morueco aumentan significativamente ya que a las 24 h obtuvieron un porcentaje de 14.6 ± 3.1 y 25 ± 3.4 a las 48 h, mientras que Kaabi *et al.* (2003) sin mantener los epidídimos de borrego en refrigeración observaron también un aumento significativo en el porcentaje de las anomalías siendo de 14.6 ± 5.3 a las 24 h y de 25.0 ± 3.7 a las 48 h, lo que confirma que manteniendo los epidídimos en refrigeración se detiene parcialmente el proceso de autólisis celular *postmortem* obteniéndose muestras con un menor porcentaje de anomalías que aquellas que son mantenidas a temperatura ambiente.

Por otra parte, el estudio del núcleo del espermatozoide permite valorar la madurez y la estabilidad del mismo, condiciones necesarias para que el espermatozoide tenga la capacidad de descondensarse en el momento adecuado durante el proceso de fecundación (McCarthy y Ward, 2000). Los estudios del ADN espermático se desarrollaron cuando se asociaron problemas de fertilidad con alteraciones de la estructura del núcleo (Evenson *et al.*, 1994), estas alteraciones han sido clasificadas

como factores indispensables de la fertilidad ya que no es posible mejorar la fertilidad aumentando el número de espermatozoides por dosis de inseminación (Saake *et al.*, 1994). Además, el daño en el ADN de los espermatozoides es considerado como una causa importante de infertilidad y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia, en especial, cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida, donde no es posible realizar una selección espermática que permita excluir espermatozoides con daño genómico. A este respecto, evidencias recientes sugieren que la fecundación de un ovocito con espermatozoides que tienen niveles altos de daño en el ADN, puede conducir a una pérdida embrionaria temprana, disminución de las tasas de gestación (Henkel *et al.*, 2004), morbilidad en la descendencia, incluido cáncer durante la niñez (Pettersson *et al.*, 2004), infertilidad en la adultez (Agarwal y Said, 2003; Agarwal *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2003a), enfermedades genéticas causadas por mutaciones dominantes (Kuhnert y Nieschlag, 2004) y enfermedades epigenéticas (Valenzuela, 2005). En este contexto, varios estudios han examinado la relación entre el daño al ADN, la calidad embrionaria, el clivaje y las tasas de gestación tanto en concepción natural (Spano *et al.*, 2000) como asistida (Bungum *et al.*, 2004; Bungum *et al.*, 2007). Entre las técnicas de reproducción asistida, destaca la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); con la utilización de esta técnica se sobrepasan las barreras fisiológicas que un espermatozoide debe superar para fecundar el ovocito incrementándose las posibilidades de fecundación. En este sentido, se deben valorar especialmente aquellas muestras que presentan un porcentaje de espermatozoides con daño nuclear significativamente superior al encontrado en individuos fértiles cuando se recurre a la realización de la técnica de ICSI (Enciso *et al.*, 2006; Ozmen *et al.*, 2007; Sergerie *et al.*,

2005; Zini y Libman, 2006). En general, los estudios del núcleo del espermatozoide demuestran una asociación negativa entre el porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN y los resultados de la inseminación intrauterina, fecundación in vitro e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Agarwal y Allamaneni, 2004). Basándose en los resultados de estos estudios, los investigadores recomiendan analizar la integridad de la cromatina de los espermatozoides antes de ser utilizados en las técnicas de reproducción asistida (Ozmen *et al.* 2007). Respecto a este parámetro, nuestros resultados (4h/4.53%, 24h/7.62%, 48h/9.28%, 72h/20.13%, 96h/22.52%, 120h/36.38%) muestran un incremento significativo en el daño después de las 72 horas *postmortem*, sin embargo, debido a diferencias metodológicas con otros estudios, principalmente porque en los estudios que se han hecho sobre daño en el ADN en el espermatozoide las muestras son criopreservadas y analizadas post-descongelamiento, no nos es posible hacer una comparación acertada con nuestros resultados; sin embargo, podemos proponer que la capacidad del espermatozoide para mantener su ADN con un mínimo daño hasta las 48 h *postmortem*, puede deberse a que el ambiente epididimal, cuenta con sistemas antioxidantes endógenos (complejo glutatión y sistema superóxido dismutasa/catalasa) que retrasan o previenen significativamente la oxidación del sustrato. Como sustrato oxidable se pueden considerar las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células: proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, ya que al reaccionar interactúan con los radicales libres del oxígeno y las ERO en un determinado microambiente: membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Droge, 2002). Se ha visto que las ERO son mediadores importantes del daño al espermatozoide y han sido

asociados a disminución en motilidad, morfología anormal y una baja capacidad de penetración al ovocito (Mann *et al.*, 1980; Aitken y Fisher, 1994; Aitken, 1995). En el epidídimo se encuentran antioxidantes como el complejo glutatión (glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa, glutamil transpeptidasa, etc.) y el sistema superóxido dismutasa/catalasa (Hinton *et al.*, 1995; Robaire *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado que altos niveles de algunos antioxidantes están correlacionados positivamente con la calidad espermática (Fraga *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1991; Fraga *et al.*, 1996; Suleiman *et al.*, 1996), por lo que estos sistemas antioxidantes podrían proporcionarle una protección prolongada al espermatozoide durante su almacenamiento en la cola del epidídimo, además la refrigeración de los testículos durante su almacenamiento *postmortem*, hace que la energía y los requerimientos de oxígeno de las células disminuyan (Chandrasoma y Taylor, 2003) con lo que es posible que el proceso de autólisis celular se detenga temporalmente.

Por otra parte, la evaluación de la integridad de la cromatina espermática, en combinación con la determinación de la motilidad y viabilidad espermáticas puede ayudar en la valoración más precisa de la calidad de las muestras seminales en los animales domésticos (Rodríguez, 2007). Nosotros encontramos correlaciones entre la fragmentación del ADN y la motilidad masal (-0.64167, $p < .0001$), motilidad progresiva (-0.66779, $p < .0001$), viabilidad (-0.58483, $p < .0001$) y anormalidades (0.42825, $p < .0001$); varios autores reconocen que hay una correlación entre los parámetros de motilidad, viabilidad espermática (Huang *et al.*, 2005; Irvine *et al.*, 2000; Kodama *et al.*, 1997; Saleh *et al.*, 2003; Tomlinson *et al.*, 2001) y anormalidades (Sheikh *et al.*, 2008), y los índices de fragmentación del ADN tanto en animales como en los seres humanos, lo que a su vez está relacionado con el éxito reproductivo

(Rodríguez y Barth, 2007). La evaluación de la integridad de la cromatina espermática es una herramienta muy importante para predecir el éxito de la inseminación artificial, la técnica de reproducción asistida usada más frecuentemente en las especies de animales domésticos (García *et al.*, 2007; López *et al.*, 2007). También permite valorar si el proceso de congelación de los espermatozoides es el adecuado para mantener la integridad del genoma espermático, condición indispensable para un correcto establecimiento de los bancos de germoplasma de diferentes especies (Boe-Hansen *et al.*, 2005; Fraser y Strzezek, 2005; Fraser y Strzezek, 2006; Peris *et al.*, 2007; Yildiz *et al.*, 2007).

Otros resultados interesantes obtenidos en este trabajo son, que al igual que Soler *et al.* (2005) en *Cervus elaphus hispanicus*, nosotros no encontramos diferencias significativas entre los espermatozoides del testículo derecho y el izquierdo, tanto en el espermograma como en cuanto al daño en el ADN, por lo que podemos asumir que los espermatozoides contenidos en los epidídimos derecho e izquierdo en el ovino se mantienen en condiciones similares. También encontramos diferencias significativas ($p < 0.0001$) en cuanto al peso del epidídimo, la motilidad masal, la motilidad progresiva, la viabilidad, concentración, anomalías espermáticas y el porcentaje de fragmentación de ADN durante el periodo en que se realizó este estudio (Agosto-Marzo). La estacionalidad reproductiva es un fenómeno adaptativo utilizado por muchos animales silvestres para enfrentar los cambios estacionales de las condiciones climáticas, de manera que los partos ocurran durante el periodo del año más favorable para las crías (Malpaux *et al.*, 1999; Parkinson y Follet, 1994); sin embargo, la domesticación ha conducido a una pérdida casi completa de esta adaptación en bovinos y porcinos, pero ha sido conservada en ovinos originarios de climas templados (Malpaux *et al.*, 1996). Al igual que nosotros, Peris *et al.* (2004) también

observan una variación del daño en el ADN entre los eyaculados de carneros a lo largo de la temporada reproductiva, sin embargo, no le atribuyen a este factor las diferencias encontradas, sino a un posible efecto de la variación individual. En nuestro estudio, tampoco nos es posible afirmar que tenga un efecto sobre estos parámetros, ya que al ser animales de rastro, no pudieron ser controlados factores como la edad, la genética, condición corporal, enfermedades subyacentes, mes de nacimiento del individuo, etc. o simplemente pudo deberse a variabilidad biológica individual.

XII. CONCLUSIONES

La integridad del ADN en el espermatozoide ovino es afectada por el tiempo *postmortem*, pudiéndose obtener células con menor daño antes de 48 h *postmortem*, ya que a partir de este tiempo el porcentaje de ADN con daño aumenta significativamente un 10.85% a las 72 h, mientras que de las 4 h hasta las 48 h *postmortem* se observa un incremento de solamente 4.75% de ADN fragmentado.

De acuerdo a los resultados del espermograma, sería viable obtener espermatozoides de cola de epidídimo de ovinos antes de 48 h *postmortem* debido a que hasta este tiempo los valores del espermograma se mantienen dentro del rango normal establecido para la especie ovina.

La sensibilidad del Ensayo Cometa la hace una técnica útil para detectar cambios en la integridad del ADN espermático a diferentes tiempos *postmortem* (4, 24 48, 72, 96, 120 h).

La calidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo izquierdo y el derecho es semejante en cuanto a viabilidad, movilidad masal y progresiva, anormalidades y fragmentación de ADN.

XIII. PERSPECTIVAS

Conocer qué factores están involucrados en la fragmentación del ADN espermático e identificar qué condiciones favorecen un aumento en el daño es importante para diseñar los protocolos óptimos de manipulación y conservación de espermatozoides que permitan mantener la integridad de su ADN, ya que ésta es requisito indispensable para el éxito reproductivo y requiere ser evaluada, especialmente cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida.

XIV. REFERENCIAS

Adamopoulos, DA.; Lawrence, DM.; Vassilopoulos, P.; Kontogeorgos, L.; Ntounis, A.; Swyer, GIM. 1979. Testosterone concentration in different functional compartments of the male reproductive tract. *Arch Androl* 3: 13-18.

Agarwal, A.; Allamaneni, SS. 2004. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 56:235-245.

Agarwal, A.; Saleh, RA.; Bedaiwy, MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79:829-843.

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

Ahmadi, A.; Ng, S. 1999b. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 284:696-704.

Aitken, RJ.; Baker, MA.; Sawyer, D. 2003. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 7:65-70.

Aitken, RJ. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 7:659-668.

Aitken, RJ.; Baker, MA. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Moll Cell Endocrinol* 250:66-69.

Aitken, RJ; Bennetts, L. 2006. Reactive oxygen species: friend or foe. En: *The sperm cell*. Eds: C. de Jonge y C. Barratt. Cambridge University Press.

Aitken, RJ; Buckingham, D.; West, K.; Wu, F.; Zikopoulos, K.; Richardson, D. 1992. Contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil* 94:451-462.

Aitken, RJ.; Buckingham, D.; Brindle, J.; Gomez, E.; Baker, H.; Irvine, D. 1995. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod* 10:2061-2071.

Aitken, R.J.; Fisher, H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays* 16:259-267.

Alexander, P.; Bahret, M.; Chaves, J.; Courts, G.; Skolky, N. 1992. *Biology*. Ed. Prentice Hall. New Jersey. pp 717.

Alonso, J.; Martín, C.; Alonso, J.; Palacón, C.; Magaña, M.; Lieckfeldt, D.; Pitra, C. 2009. Genetic diversity of the great bustard in Iberia and Morocco: risks from current population fragmentation. *Conservation Genetics* 10(2):379-390.

Alm, H.; Tomer, H.; Blottner, S.; Nürnberg, G.; Kanitz, W. 2001. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogenology* 56:817-829

Amann, R.P.; Hay, S.R.; Hammerstedt, R.H. 1982. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biol Reprod* 27:723-733.

Andersen, K. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene* 10:1-4.

Arends, M.; Wyllie, A. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32:223-254

Arents, G.; Moudrianakis, E. 1993. Topography of the histone octamer surface: Repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci* 90:10489-10493.

Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 89:65-75.

Baccetti, B.; Collodel, C.; Piomboni, P. 1996. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicr Cytol Path* 28:587-596.

Balhorn, R. 1989. Mammalian protamines structure and molecular interactions. En: *The molecular biology of chromosome function*. Ed: K.W. Adolph. Springer-Verlag New York. Pp. 366-395.

Ballachey, BE.; Hohenboken, WD.; Evenson, DP. 1987. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol Reprod* 36:915-925.

Barroso, G.; Morshedi, M.; Oehninger, S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15:1338-1344.

Beckman, K.; Ames, B. 1997. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272:19633-19636.

Bedford, J.; Calvin, H. 1974. The occurrence and possible functional significance of SS cross links in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 188:137-155.

Benchaib, M.; Braun, V.; Ressenkoff, D.; Lornage, J.; Durand, P.; Niveleau, A.; Guerin, J. 2005. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 20(3):768-773.

Bennetts, LE.; Aitken, RJ. 2005. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 71:77-87.

Bize I.; Santander, G.; Cabello, P.; Driscoll, D.; Sharpe, C. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 44:398-403.

Blottner, S.; Warnke, C.; Tuchscherer, A.; Heinen, V.; Torner, H. 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 65:75-88.

Boe-Hansen, G.B.; Ersboll, AK.; Greve, T.; Christensen, P. 2005. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 63:2006-2019.

Bohr, VA. 2002. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Bio Med* 32: 804-812.

Boretto, M.; Gibbons, E.; Bunge, M.; Cueto, I.; Bidinost, F. 2002. Calidad seminal post-descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos. *Rev Med Vet* 83(4):185-188.

Braun, RE. 2001. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28: 10–12.

Brewer, L.; Corzett, M.; Lau, EY.; Balhorn, R. 2003. Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *J Biol Chem* 278:42403–42408.

Bungum, M.; Humaidan, P.; Axmon, A.; Spano, M.; Bungum, L.; Erenpreiss, J.; Giwercman, A. 2007. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 22:1 174–179.

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

Caldecott, KW. 2007. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair* 6:443–453.

Cardona, W.; Cadavid, A. 2004. Interacción intergametos: Breve revisión. *Arch Esp Urol* 57:1107.

Carlson, B. 2009. Human Embriology and Developmental Biology. Edt. Elsevier. 4a. edición. 507 pp.

Carnevali, S.; Petruzzelli, S.; Longoni, B.; Vanacore, R.; Barale, R.; Cipollini, M.; Scatena, F.; Paggiaro, P.; Celi, A.; Giuntini, C. 2003. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol-Lung C* 284: L955–L963.

Carrell, D.; Liu, L.; Peterson, C.; Jones, K.; Hatasaka, H.; Erickson, L. 2003. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 49:49-55.

Cirovic, D. 2006. First record of the racoon dog (*Nyctereutes procyonoides* Gray, 1834) in the former Yugoslav Republic of Macedonia. *Eur J Wildl Res* 52:136–137.

Clarkson, P.; Thompson, H. 2000. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *Am J Clin Nutr* 72 637S–46S.

- Chandrasoma, P.; Taylor, C. 2003. Anormalidades de los tejidos intersticiales. En: *Patología General*. Prentice – Hall, Inc pp. 27-28.
- Codrington, A.; Hales, B; Robaire, B. 2007. Chronic cyclophosphamide exposure alters the profile of rat sperm nuclear matrix proteins. *Biol Reprod* 77:303-311
- Collins, AR. 2004. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. Principles. *Mol Biotech* 26:249-261.
- Cooper, TG. 2007a. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl* 9:533–539.
- Cooper, TG. 2007b. The human epididymis, sperm maturation and storage. *ANIR-ANHP* 9:18–21.
- Cooper, TG.; Raczek, S.; Yeung, CH.; Schwab, E.; Schulze, H.; Hertle, L. 1992. Composition of fluids obtained from human epididymal cysts. *Urol Res* 20:275–280.
- Cooper, TG.; Yeung, CH. 2006. Sperm maturation in the human epididymis. En: *The Sperm Cell*. Eds. C. De Jonge y C. Barrat. Cambridge University Press.
- Cortés, D. 1990. Histological versus stereological methods applied at spermatogonia during normal human development. *Scand J Urol Nephrol* 24(1):11-15.
- Cyr, DG. 2001. Cell-cell interactions in the epididymis. En: *Andrology in the 21st Century*. Eds: B Robaire, H Chemes y CR Morales. Englewood, NJ. Medimond Publishing Co. pp. 215–226.
- De Jonge, C. 2000. Paternal contributions to embryogenesis. *Reprod Med Rev* 203–214.
- De Jonge, C. 2002. The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Hum Fertil* 5:51-53.
- De Vos, A.; Van del Velde, H.; Joris, H.; Verheyen, G.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A. 2003. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 79: 42-48.

- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47.
- Duran, E.; Morshedi, M.; Taylor, S.; Oehninger, S. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 17:3122-3128.
- Eddy, EM; Toshimori, K.; O'Brien, DA. 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 61:103-115.
- Eliasson, R.; Treichl, L. 1971. Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil steril* 22(2):134-7.
- Enciso, M.; Muriel, L.; Fernandez, JL.; Goyanes, V.; Segrelles, E.; Marcos, M.; Gosalvez, J. 2006. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl* 27:106-11.
- Evans, G.; Maxwell, W. 1990. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Zaragoza, España: Acribia.
- Evenson, D.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, MR. 1980. Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility. *Science* 210:1131-1133.
- Evenson, D.; Jost, L. 1994. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Cell Biol* 42:159-176.
- Evenson, D.; Jost, L.; Marshall, D.; Zinaman, M.; Clegg, E.; Purvis, K. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14(4):1039-1049.
- Evenson, D.; Larson, K; Jost, L. 2002. Sperm chromatin structure andrology lab corner assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 23(1):25-43.
- Fawcett, D. 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44:394-436.
- Finch, J.; Klug, A. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Biochemistry* 73(6):1897-1901.

Flickinger, C.J. 1985. The effects of vasectomy on the testis. *N Engl J Med* 313:1283-1285.

Ferguson, D.O.; Alt, F. 2001. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* 20(40):5572-5579.

Finkel, T.; Holbrook, N. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.

Flesch, F.M.; Gadella, B. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1469:197-235

Fournier-Delpech, S.; Courtens, J.L.; Pisselet, C.L.; Delaleu, B.; Courrot, M. 1982. Acquisition of zona binding by ram spermatozoa during epididymal passage, as revealed by interaction with rat oocytes. *Gamete Research* 5(4):403-408.

Fraga, C.; Motchnik, P.; Shigenaga, M. 1991. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11003-11006.

Fraga, C.; Motchnik, P.; Wyrobek, A. 1996. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 351:199.

Fraser, L.; Strzezek, J. 2005. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod Domest Anim*. 40:530-6.

Fraser, L.; Strzezek, J. 2006. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci*.

García, V.; Paz, P.; Martínez, F.; Álvarez, M.; Gómez, S.; Bernardo, J.; Anel, E.; Anel L. 2007. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int J Androl* 30:88-98.

Garde, J.; Ortiz, N.; García, A.; Gallego, L.; Landete-Castillejos, T.; López, A. 1998. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch Androl* 41:195-202.

Garde, J.; Perez, S.; Aguado, M.; Ayllon, E.; Garrido, D.; Montoro, V. 1995. Live birth of hybrid (*O. Musimon* x *O. aries*) lambs following intrauterine insemination in domestic sheep with mouflon semen obtained 40 hours *postmortem*. *Theriogenology* 43:218-225.

Garner, D.; Hafez, E. 1996. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez, E.S.E. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. Interamericana, McGraw-Hill, México. 1996.

Genesca, A.; Caballin, M.; Miró, R.; Benet, J.; Germá, J.; Egozcué, J. 1992. Repair of Human Sperm Chromosome Aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 89:181-186.

Gilmore, JA.; McGann, LE.; Ashworth, E.; Acker, JP.; Raath, JP.; Bush, M.; Critser, JK. 1998. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Anim Reprod Sci* 53:277-297.

Gomendio, M. 2003. La variabilidad genética en poblaciones animales y sus efectos sobre la reproducción. *La Tierra*. Febrero. Suplemento.

Gómez, E.; Buckingham, D.; Brindle, J.; Lanzafame, F.; Irvine, D.; Aitken, R. 1996. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 17:276-287.

González, A.; Cortés, J.; Sánchez, L. 2010. *Evaluación de la capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de ovino a diferentes tiempos postmortem*. México: Tesis de Lic. Universidad Autónoma Metropolitana.

Gorczyca, W.; Traganos, F.; Jesiónowska, H.; 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. *Exp Cell Res* 207:202-205.

Griffith, JD. 1976. Visualization of prokaryotic DNA in a regularly condensed chromatin-like fiber. *Cell Biology* 73(2):563-567.

- Guyton, AC. 2006. Tratado de Fisiología Médica. 11ª ed. Madrid: Elsevier España.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-322.
- Harrouk, W.; Codrington, A.; Vinson, R.; Robaire, B.; Hales, B. 2000. Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutat Res* 461:229-241.
- Hartley, M. 2005. A seroprevalence survey of *Toxoplasma gondii* in common wombats (*Vombatus ursinus*). *Eur J Wildl Res* 51:65-67.
- Hartmann, A.; Agurell, E.; Beevers, C. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18:45-51.
- Hell, P.; Plavy, R.; Slamecka, J.; Gasparik, J. 2005. Losses of mammals and birds on roads in the Slovak part of the Danube Basin. *Eur J Wildl Res* 51:35-40.
- Henkel, R.; Hajmohammad, M.; Stalf, T.; Hoogendijk, C.; Mehnert, C.; Menkveld, R. 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 81:965-72.
- Hinton, BT.; Palladino, MA.; Rudolph, D.; Labus, JC. 1995. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 7:731-745.
- Hinton, BT.; Pryor, JP.; Hirsch, AV.; Setchell, BP. 1981. The concentration of some inorganic ions and organic compounds in the luminal fluid of the human ductus deferens. *Int J Androl* 4:457-461.
- Hishinuma, M.; Suzuki, K.; Sekine, J. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology* 59:813-820.
- Holstein, A.; Schulze, W.; Davidoff, M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite of treatment. *Reprod Biol Endocrin* 1:107.

Host, E.; Lindenberg, S.; Smidt-Jensen, S. 2000a. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstet Gyn Scan* 79:189-193.

Host, E.; Lindenberg, S.; Smidt-Jensen, S. 2000b. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gyn Scan* 79:559-563.

Huang, C.; Lin, D.; Tsao, M.; Cheng, C.; Liu, H.; Lee, S. 2005. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 84:130-140.

Inaba, K. 2003. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zool Sci* 20:1043-1056.

Inoue, M.; Sato, E.; Nishikawa, M.; Park, A.; Kira, Y.; Imada, I.; Utsumi, K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 10(23):2495-2505.

Irvine, DS.; Twigg, JP.; Gordon, EL. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21:33-44.

IUCN. 2011. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. <<http://www.iucn.org>> [Consulta: 25 Mayo 2011].

Jaramillo, J. 1993. Muerte Clínica, Muerte Somática y Muerte Encefálica. *Rev Mex Anest* 16:81-84.

Johnson, M.; Everitt, B. 2007. Johnson & Everitt's Essential Reproduction. Blackwell Publications.

Johnson, LA.; Weitze, KF.; Fiser, P.; Maxwell, WM. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reprod Sci* 62:143-172.

Jones, R. 2004. Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol Reprod* 71:1405-1411.

Kaabi, M.; Carbajo, M.; Rouissi, H.; Anel, E.; Álvarez, M.; Boixo, J.; García, C.; Anel, L. 1999. Efecto de la conservación pos-mortem de epidídimos de morueco sobre la evolución de malformaciones en los

espermatozoides antes y después de la congelación. *Reproducción* XXIV:3 187-191.

Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraes, P., Anel, L., 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60:1249-1259.

Kaneko, T.; Whittingham, D.; Overstreet, J. 2003. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biol Reprod* 69:1859.

Kasinsky, H. 1989. Specificity and Distribution of Sperm Basic Proteins. En: *Histones and Other Basic Nuclear Proteins*. Eds: L.S. Hinilica, G. Stein y J. Stein. CRC Press. Boca Raton Florida.

Kerr, JB. 1992. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil* 95: 825-830

Kierszenbaum, AL. 2002. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev* 63:1-4.

Kimura, Y.; Yanagimachi, R. 1995. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 121:2397-2405.

Kitchin, KT. 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharm* 172: 249-261.

Kobayashi, T.; Miyazaki, T.; Natori, M. 1991. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility-superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod* 6:987-991.

Kodama, H.; Yamaguchi, R.; Fukuda, J.; Kasai, H.; Tanaka, T. 1997. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 68:519-524.

- Koshimoto, C.; Gamliel, E.; Mazur, P. 2000. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology* 41:204–231.
- Kruger, TF.; Menkveld, R.; Stander, H.; Lombard, J.; Van der Merwe, P.; Van Zyl, A.; Smith, K. 1986. Sperm morphological features as a prognostic factor *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 46:1118-1123.
- Kuhnert, B.; Nieschlag, E. 2004. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update* 10:327-329.
- Kumaravel, TS.; Jha, AN. 2006. Reliable comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res* 605:7–16.
- Kurtz, K.; Martinez, F.; Ausio, J.; Chiva, M. 2007. Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *J Cell Biochem* 102: 1432–1441.
- Larson, K.; Brannian, J.; Hansen, K.; Kasperson, K.; Aamold, E.; Evenson, D. 2003. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 80(4):895–902.
- Lieckfeldt, D.; Hett, AK.; Ludwig, A.; Freyhof, J. 2006. Detection, characterization and utility of a new highly variable nuclear marker region in several species of cyprinid fishes (*Cyprinidae*). *Eur J Wildl Res* 52:63–65.
- Loft, S.; Kold-Jensen, T.; Hjollund, NH.; Giwercman, A.; Gylleborg, J.; Ernst, E.; Olsen, J.; Scheike, T.; Poulsen, HE.; Bonde, JP. 2003. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod* 18(6):1265-1272.
- López, C.; Crespo, F.; Arroyo, F.; Fernández, JL.; Arana, P.; Johnston, SD.; Gosálvez, J. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology*. 68:1240-50
- Malpoux, B.; Thiery, C.; Chemineau, P. 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev* 39:355-366.

Malpoux, B.; Vigué, C.; Skinner, C.; Thiery, C.; Pelletier, J.; Chemineau, P. 1996. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Anim Reprod Sci* 42:109-117.

Mann, T.; Jones, R.; Sherins, R. 1980. Oxygen damage, lipid peroxidation, and motility of spermatozoa. En: *Testicular development, structure and function*. Eds: A. Steinberger y E. Steinberger. Raven Press, New York, USA pp. 497-501.

Martínez, F.; García, V.; Álvarez, M.; Herraéz, P.; Anel, L.; Paz, P. 2005. Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and their Changes Through the Cryopreservation Process. *Biol Reprod* 72:316-327.

Matsuda, Y.; Tobarí I. 1988. Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light and methyl and ethyl methansulfonate. *Mutat Res* 198:131-144.

McCarthy, S.; Ward, S. 2000. Interaction of exogenous DNA with the nuclear matrix of live spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 56:235-237.

McCord, J. 2000. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med* 108:652-659.

McLachlan, Rl. 2000. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14:345-362.

McPherson, S.; Longo, F. 1993. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 158:122-130.

Meistrich, ML.; Mohapatra, B.; Shirley, CR.; Zhao, M. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111:483-488.

Mitropoulos, D.; Deliconstantinos, G.; Zervas, A. 1996. Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potencial role for nitric oxide and peroxy-nitrite in sperm dysfunction. *J Urol* 156:1952-1958.

Morse-Gaudio, M.; Risley, M. 1994. Topoisomerase II expression and VM-26 induction of DNA breaks during spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J Cell Sci* 107:2887-2898.

National Library of Medicine. <www.lookfordiagnosis.com> [Consulta: 20 Mayo 2011].

Norbury, C.J.; Hickson, I. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol* 41:367-401.

Norén, K.; Meironyté, D. 2000. Certain organochlorine and organobromine contaminants swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere* 40:1111-1123.

Nyunoya, T.; Monick, M.; Klingelhutz, A; Glaser, H.; Cagley, J.; Brown, C.; Matsumoto, E.; Aykin-Burns, N.; Spitz, D.; Oshima, J.; Hunninghake, G. 2009. Cigarette Smoke Induces Cellular Senescence via Werner's Syndrome Protein Down-regulation. *Am J Resp Crit Care* 179:279-287.

Oehninger, SC.; Kruger, TF.; Simon, T.; Jones, D.; Mayer, J.; Lanzendorf, SI.; Toner, JP.; Muasher, SJ. 1996. A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11:1086-1089.

Ogura, A.; Matsuda, J.; Yanagimachi, R. 1994. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7460-7462.

Olive, PL. 1989. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res* 117:79-92.

Östling, O. ; Johanson, KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.

Ott, RS.; Goffaux, M.; Thibier, M. 1987. Examen morphologique des spermatozoids. *El & Ins* 2215-20.

Ozmen, B.; Koutlaki, N.; Youssry, M.; Diedrich, K.; Al-Hasani, S. 2007. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online*. 14:384-95.

Parkinson, J.; Follet, K. 1994. Effect of thyroidectomy upon seasonally in rams. *J Reprod Fertil* 101:51-58.

Paschen, W. 2000. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull* 53:409.

Paulenz, H.; Ådnøy, T.; Söderquist, L. 2007. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49:26

Pentikainen, V.; Erkkilä, K.; Dunkel L. 1999. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 276:E310–E316.

Peris, S.I.; Bilodeau, J.F.; Dufour, M.; Bailey, J.L. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 74:878-92.

Peris, S.I.; Morrier, A.; Dufour, M.; Bailey, J. 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl* 25(2): 224-233.

Pettersson, A.; Kaijser, M.; Richiardi, L.; Askling, J.; Ekblom, A.; Akre, O. 2004. Women smoking and testicular cancer: one epidemic causing another? *Int J Cancer* 109:941-944.

Piperakis, S.M. 2009. Comet assay: a brief history. *Cell Biol Toxicol* 25:1-3.

Pitra, C.; Lutz, W. 2005. Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of introduced sika deer, *Cervus nippon*, in Germany and Austria. *Eur J Wildl Res* 51:95–100.

Potts, G.R. 2005. Incidence of ingested lead gunshot in wild grey partridges (*Perdix perdix*) from the UK. *Eur J Wildl Res* 51: 31–34.

Rignell, A.; Rylander, L.; Giwercman, A.; Jönsson, B.; Lindh, C.; Eleuteri, P.; Rescia, M.; Cordelli, E.; Spano, M.; Hagmar, L. 2005. Exposure to PCBs and p,p'-DDE and human sperm chromatin integrity. *Environ Health Persp* 113:175-180.

Robaire, B.; Hinton, B.T.; Orgebin-Crist, M.C. 2006. The epididymis. En: *Knobil and Neil's Physiology of Reproduction*. Ed: J.D Neil. 3a ed. New York: Elsevier 1071 1148.

Robbins, R.; Cotran, R. 2007. Adaptaciones celulares, lesión celular y muerte celular. En: *Robbins y Cotran, Patología estructural y funcional*. Elsevier Saunders. Séptima edición.

Roca, J.; Mezquita, C. 1989. DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids. *Embo J* 8:1855–1860.

Rodríguez, H. 2007. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev* 19:91-101.

Rodríguez, H.; Barth, AD. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64:39-54.

Rodríguez, I.; Ody, C.; Araki, K.; Garcia, I.; Vassalli, P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 16:2262–2270.

Said, S.; Pellerin, M.; Guillon, N.; Debias, F.; Fritz, H. 2005. Assessment of forage availability in ecological studies. *Eur J Wildl Res* 51:242–247.

Sakkas, D. 2001. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 16:2160-5.

Saacke, RG.; Nadir, S.; Nebel, RL. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 41:45-50.

Saleh, R.; Agarwal, A.; Sharma, R.; Said, M.; Sikka, C.; Thomas, J. Jr. 2003. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 80:1431-1436.

Santiago, J.; Toledano, A.; Pulido, A.; Gómez, A.; López, A. 2004. Birth of live spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. *Theriogenology* 66(2):283-291.

Sanz-Elorza, M.; Dana, ED.; González, A.; Sobrino, E. 2003. Changes in the high-mountain vegetation of the Central Iberian Peninsula as a probable sign of global warming. *Ann Bot (London)* 92:273-280.

Saragusty, J.; Gacitua, H.; King, R.; Arav, A. 2006. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazelle* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology* 66(4):775-784.

Sepaniak, S.; T. Forges.; H. Gerard.; B. Foliguet.; M. Bene.; P. Monnier. 2006. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 223 (1-2) 54-60.

Sergerie, M.; Laforest, G.; Bujan, L.; Bissonnette, F.; Bleau, G. 2005. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20:3446-51.

Setchell, BP. 1977. En: *Reproduction in Domestic Animals*. Eds: H.H. Cole y P.T. Cupps. New York: Academic Press.

Setchell, B.; Maddocks, S; Brooks, D. 2005. Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of the Male Reproductive Tract. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. P. Wassarman y J. D. Neill. Tercera edición. Academic Press. Pp. 1063-1175.

Shakeri, M.; Roshanfekar, H.; Mamoei, M.; Mirzadeh, K. 2008. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered *postmortem*. *Assian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 3(6):400-408.

Shaman, J.; Ward, W. 2006. Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. En: *The sperm cell*. Eds: C. De Jonge y C. Barrat. Cambridge University Press.

Sheikh, N.; Amiri, I.; Farimani, M.; Najafi, R.; Hadeie, J. 2008. Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Iranian J Reprod Med* 6(1):13-18.

Simon, R.; Felsenfeld, G. 1979. A new procedure for purifying histone pairs H2A + H2B and H3 + H4 from chromatin using hydrosylapatite. *Nucleic Acids Res* 5:3409-3426.

Singh, NP.; McCoy, MT.; Tice, RR.; Schneider, EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.

Sinha Hikim, A.; Wang C.; Leung, A.; Swerdloff, RS. 1995. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 136:2770-2775.

Skakkebaek, N.; Jørgensen, N.; Main, K.; Rajpert, E.; Leffers, H. 2005. Is human fecundity declining? *Int J Androl* 29: 2-11.

Soler, AJ., Estes, MC.; Fernandez-Santos, MR.; Garde, JJ. 2005. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 °C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 64:1503-1517.

Sotolongo, B.; Huang, t.; Isenberger, E.; Ward, W. 2005. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl* 26:272-280.

Spano, M.; Bonde, JP.; Hjollund, HI.; Kolstad, HA.; Cordelli, E.; Leter, G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 73:43-50.

Suleiman, A.; Elamin, M.; Zaki, S. 1996. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 17:530-537.

Sumner, A. 2003. Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Science, Oxford. 287 pp.

Sutovsky, P.; Manandhar, G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: *The Sperm Cell*. Eds: C. De Jonge y C. Barrat. Cambridge University Press.

Tateno, H.; Kimura, Y.; Yanagimachi, R. 2000. Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biol Reprod* 63:341-346.

Tesarik, J.; Hazout, A.; Mendoza, C. 2004. Enhancement of embryo developmental potential by a single administration of GnRH agonist at the time of implantation. *Hum Reprod* 19:1176-1180.

The school of molecular and cellular biology/University of Illinois at Urbana-Campaign. <www.mcb.illinois.edu.> [Consulta: 20 Mayo 2011].

Tice, R. 1995. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. En: *Environmental Mutagenesis*. Eds: D. H. Phillips y S. Venitt. Oxford UK. Pp. 315-339.

Tomlinson, M.; Moffatt, O.; Manicardi, C.; Bizzaro, D.; Afnan, M.; Sakkas, D. 2001. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 16:2160-2165.

Trump, BF.; Berezesky, I. 1998. The reactions of cells to lethal injury: oncosis and necrosis—the role of calcium. En: *When Cells Die—A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death*. Ed: RA Lockshin. New York: Wiley-Liss. p 57.

Turner, T. 2008. De Graaf's Thread: The Human Epididymis. *J Androl* 29 (3) 237-250.

Valenzuela, CY. 2005. The risk of congenital malformations and genomic imprinting defects in assisted reproductive technologies and nuclear transfer cloning. *Rev Med Chile* 133:1075-1080.

Vidament, P.; Ecot, P.; Noue, C.; Bourgeois, M.; Magistrini, A.; Palmer, E. 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54:907-919.

Ward, S. 1994. The structure of the sleeping genome: Implications of sperm DNA organization of somatic cells. *J Cell Biochem* 55 77-82.

Ward, M.; Ward, S. 2004. A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod Fertil Dev* 16:547-554.

Wellejus, A.; Poulsen, H.; Loft, S. 2000. Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells in vivo and in vitro. *Free Radical Res* 32: 75-83.

Wildt, DE. 1992. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Animal Reproduction Science* 28:247-257.

Wildt, DE. 1995. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod Fertil Dev* 7:811-824.

Wildt, DE.; Howard, J.; Brown, J. 2001. Reproductive sciences in carnivore conservation. En: *Carnivore Conservation*. Eds: J. L. Gittleman, et al. Cambridge University Press. Pp. 359-371.

Yanagida, K.; Yanagimachi, R.; Perreault, SD.; Kleinfeld, RG. 1991. Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol Reprod* 44:440-447.

Yanagimachi, R. 2005. Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. P. Wassarman y J. D. Neill. Tercera edición. Academic Press. Pp. 1063-1175.

Yildiz, C.; Ottaviani, P.; Law, N.; Ayearst, R.; Liu, L.; McKerlie, C. 2007. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction* 133:585-95.

Yu, J.; Leibo, S. 2002. Recovery of motile, membrane intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 degrees C. *Theriogenology* 57:1179-90.

Zindl, C.; Asa, CS.; Gunzel-Apel, AR. 2006. Influence of coolingrates and addition of Equex pasta on cooled and frozenthawed semen of generic gray (*Canis lupus*) and Mexican gray wolf (*C. L. baileyi*). *Theriogenology* 66:1797-1802.

Zini, A.; Bielecki, R.; Phang, D.; Zenzes, M. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75:674-77.

Zini, A.; Libman, J. 2006. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Cmaj* 175:495-500.

Zlatanova, J.; Sanford, L; Van Holde, K. 1998. Chromatin Fiber Structure: Morphology, Molecular Determinants, Structural Transitions. *Biophys J* 74:2554-2566.