

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

“Fragmentación de ADN en espermatozoides de epidídimo en ovinos a diferentes horas *postmortem*”

PRESENTADOR DE SERVICIO SOCIAL

Héctor Antonio Juárez Ibarra

Matricula: **2172034974**

ASESOR INTERNO

DR. ALEJANDRO ÁVALOS RODRÍGUEZ

NÚM. ECONÓMICO: 26809

ASESOR EXTERNO

DRA. MARIELA ADRIANA YDIAQUEZ MIRANDA

NÚM. ECONÓMICO: 44556

Lugar de realización: Laboratorio de Modelos Morfológicos de Animales, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, calzada del hueso 1100, col. Villa quietud, delegación Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México, tel. 54837000.
Fecha de inicio de 27 de octubre del 2024 y término 27 de abril del 2025.

Índice	Tema	Página
I	INTRODUCCIÓN	3
II	MARCO TEÓRICO	4
2.1	Anatomía y Fisiología del Epidídimo	4
2.2	Espermatozoide	5
2.2.1	Maduración Espermática	5
2.2.2	Extracción de Espermatozoides del Epidídimo	5
2.3	Análisis Espermático	6
III	HIPÓTESIS	9
IV	OBJETIVOS	9
4.1	Objetivo General	9
4.2	Objetivos Específicos	9
V	JUSTIFICACIÓN	9
VI	METODOLOGÍA	10
6.1	Obtención de Muestras	10
6.2	Recolección y Transporte de las Muestras	10
6.3	Lavado Retrógrado Epididimal	10
6.4	Espermograma	11
6.5	Tinción de Naranja de Acridina para evaluar Fragmentación del ADN espermático	12
VII	ACTIVIDADES REALIZADAS	13
VIII	RESULTADOS	13
IX	METAS REALIZADAS	
XI	BIBLIOGRAFÍA	13

I.- Introducción:

La extracción de espermatozoides de cola de epidídimo en carneros y su utilización ha sido estudiada desde hace varias décadas por algunos autores, (Kaabi et al., 2003 y Tamayo-Canul et al., 2011) en diversas técnicas de reproducción asistida hasta la actualidad.

Antes que el espermatozoide entre al tracto reproductor de la hembra y pueda tener oportunidad de fecundar al ovocito, debe tener la membrana plasmática íntegra y no presentar fragmentación de ADN, entre otras cosas. El ADN del espermatozoide puede verse modificado por diferentes eventos, como su paso desde los túbulos seminíferos hasta el epidídimo, la activación de caspasas y endonucleasas, efecto de agentes tóxicos del medio, temperatura o incluso efecto de almacenamiento. Por ello, es importante cuidar la integridad del genoma del macho para aumentar las posibilidades de una gestación (Sakkas y Álvarez, 2010). Una forma de preservar el germoplasma de estos animales es la colecta de espermatozoides del epidídimo (Ribeiro, 2013), sin embargo, factores que ocurren entre el tiempo *post-mortem* y la recuperación de los espermatozoides (Kaabi et al., 2003) y la temperatura de almacenamiento de los epidídimos (Monteiro et al., 2013) afectan la calidad posterior a la descongelación y la fertilidad de los espermatozoides epididimales *post-mortem*. Pese a que cada vez hay más conocimientos sobre la capacidad fértil de espermatozoides epididimales, aún faltan estudios en fragmentación del ADN de los espermatozoides durante su almacenamiento *post-mortem* y poder predecir su impacto en la fecundación y gestación. Por tal motivo, se investigará el porcentaje de fragmentación de ADN de los espermatozoides ovinos tomados a diferentes tiempos *post-mortem*.

II.- Marco teórico

2.1 Anatomía y Fisiología del epidídimo

El sistema genital masculino está integrado por los órganos sexuales primarios representados por las gónadas o testículos; los órganos sexuales secundarios que comprenden un sistema canalicular constituido por la rete testis, los conductos eferentes, epidídimo y conducto deferente; los órganos sexuales accesorios cuyas secreciones forman el plasma seminal (próstata, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales o de Cowper y glándulas uretrales y el pene) (Pérez, 2009).

Se reconocen tres regiones anatómicas del epidídimo. La cabeza en la que una cantidad variable de conductores eferentes (13-20), se unen al conducto epididimario, formando una estructura aplanada en uno de los polos testiculares, el conducto que puede llegar a ser muy contorneado y la pared del conducto del epidídimo la cual tiene una notable capa de fibras musculares circulares y un epitelio pseudoestratificado de células cilíndricas (Hafez y Hafez, 2002). El epidídimo no solo es un conducto para los espermatozoides, si no que aporta un medio adecuado en el que estos se concentran, maduran y adquieren la capacidad de fecundación (Cunningham y Klein, 2009). El conducto deferente es la continuación de la cola del epidídimo, tienen un calibre más pequeño. Al inicio tienen un curso sinuoso, dorsalmente, a lo largo del borde caudal del testículo, para luego aparecer recto y situarse en la parte caudal del cordón espermático (Sisson y Grossman, 2001). El conducto deferente o vasa deferentia atraviesa los anillos inguinales y llega al abdomen, conectando la cola del epidídimo con la porción pélvica de la uretra. En la mayoría de las especies la porción terminal de estos conductos se agranda para formar una ampolla, la cual es una

reserva adicional de los espermatozoides, particularmente en los ovinos esta tiene una función secretora y no de almacenamiento (Cunnigham y Klein, 2009).

2.2 Espermatozoide

La célula germinal masculina se produce en la gónada (testículo) mediante un proceso permanente de división de las células germinales o espermatogonias. El proceso de división meiótica denominado espermatogénesis está controlado hormonalmente por el eje hipófisis-hipotálamo-gónada. A partir de cada espermatogonia se producen cuatro espermatoцитos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y a la vez están en comunicación con la célula nutricia o de Sertoli; estas últimas, a partir de moléculas señalizadoras, inducen el proceso denominado espermiogénesis o metamorfosis que convierte las espermátides en espermatozoides (Olivera 2006).

2.2.2 Maduración espermática

Es la fase en donde se observan las características finales de los espermatozoides: forma de la cabeza característica de cada especie (oval y plana), cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma; y la cola compuesta por las piezas media, principal y terminal; en la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice.

En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola originando la llamada gota citoplasmática (Olivera, 2006).

El proceso de maduración termina con la espermiación, o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero. Mediante movimientos peristálticos los espermatozoides son transportados de la rete testis a los ductos eferentes y de allí al epidídimo en cuya cola se almacenan (Olivera, 2006).

2.3 Extracción de espermatozoides del epidídimo

La recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo se puede realizar por aspiración (Sharma et al., 1997), flotación (Hewitt et al., 2001), descarga retrógrada (Garde et al., 1994) y una técnica de descarga retrógrada modificada (Muradás et al., 2006). Según Turri et al. (2012), la técnica de descarga retrógrada es mejor que el método de flotación en términos de calidad de esperma, motilidad total y la viabilidad de los espermatozoides de epidídimo en el toro (Pedraza, 2019).

Para la obtención de los espermatozoides se disecciona el epidídimo y se coloca una cánula en el conducto deferente, posteriormente se secciona el epidídimo en la zona de unión entre el cuerpo y la cola del epidídimo y se realiza un lavado retrógrado de la cola del epidídimo con un diluyente adecuado. Hay que tener en cuenta que en la cabeza del epidídimo se eliminan fluidos sobrantes del espermatozoide inmaduro, en el cuerpo los espermatozoides comienzan a tener capacidad fecundante y cola donde fundamentalmente se almacenan espermatozoides maduros (Muradas 2006).

2.4 Análisis espermático

Concentración espermática

La determinación de la concentración espermática es una de las valoraciones rutinarias de contrastación seminal más importantes, ya que la tasa de dilución depende de ella y por ende el número de dosis por eyaculado. La concentración espermática en ovinos es de 2000-6000 x 10⁶/ml. Existen varias formas para realizar este cálculo, siendo las más utilizadas las cámaras de recuento celular (Neubauer, Burkner, Thoma y Makler) y en menor medida se utilizan los contadores celulares electrónicos y los programas informáticos de análisis seminal (Tabarez y Grajales, 2021).

Motilidad espermática

Su determinación nos puede proporcionar un medio relativamente sencillo para conocer la calidad seminal. A pesar de que presenta una pobre correlación con la fertilidad in vivo es el parámetro más utilizado junto con la concentración espermática (Tabarez y Grajales, 2021).

Motilidad masal

Esta observación se hace colocando una gota de semen en un portaobjeto precalentado a 37 °C para que los espermatozoides no mueran por un choque térmico, y se observa en el microscopio bajo el lente de 4 ó 10X sin necesidad de colocar el cubreobjeto. La motilidad masal se estima sobre la base del vigor de la onda de movimiento, asignando un puntaje en una escala que va de cero a cinco (Tabarez y Grajales, 2021).

Motilidad individual progresiva

La motilidad individual ofrece una visión del movimiento progresivo rectilíneo de los espermatozoides, la motilidad está correlacionada positivamente con la concentración y el porcentaje espermatozoides viables y negativamente con el porcentaje de formas anormales; el valor de esta variable además, va a depender de la temperatura de evaluación y el tipo de diluyente utilizado (Tabarez y Grajales, 2021).

Morfología espermática

Las anomalías espermáticas significan que los espermatozoides no tienen la conformación de cabezas y/o colas deseables, en consecuencia su capacidad fecundante podría estar afectada en distintos grados. El semen ovino normalmente puede presentar de un 70 a un 90% de espermatozoides normales. Para poder observar las células se utilizan diferentes tinciones espermáticas, como azul de metileno o rosa de bengala. Entre las tinciones usadas para la evaluación de la morfometría se encuentran Diff-Quick recomendada por la OMS, Hematoxilina de

Harris, Hemacolor y más recientemente se ha desarrollado la tinción SpermBlue tanto para humanos como animales (Tabarez y Grajales, 2021).

Viabilidad espermática

Normalmente se puede encontrar el semen de machos adultos con 80 al 90% de espermatozoides vivos. También se pueden obtener eyaculados con más de 30 % de células muertas, esto puede indicar un detrimento en la fertilidad. El porcentaje de espermatozoides vivos se puede determinar por medio de coloración. Las tinciones más utilizadas probablemente sean la de eosina-nigrosina y la de Tripan azul. Ambas son tinciones de membrana impermeable, en las que aquellos espermatozoides que presenten una integridad estructural en su membrana no van a permitir la penetración del colorante; por lo tanto, los que aparezcan teñidos se considerarían muertos (Tabarez y Grajales, 2021).

Fragmentación del ADN espermático.

El origen de la fragmentación del ADN en los espermatozoides se relaciona, en algunos casos, con actividades enzimáticas, por acción de nucleasas, ya sean endógenas o exógenas (Gosálvez et al., 2008).

Actualmente, existen cuatro pruebas principales de fragmentación del ADN de los espermatozoides, que incluyen el ensayo Comet, Tunel, el ensayo de la estructura de la cromatina de los espermatozoides (SCSA) y la prueba del naranja de acridina (AOT). El ensayo Comet es una técnica de microscopio óptico en la que los espermatozoides se mezclan con agarosa fundida y luego se colocan en un portaobjetos de vidrio. Las células se lisan y luego se someten a una electroforesis horizontal. El ensayo Tunel, otra técnica de microscopio óptico, transfiere un nucleótido marcado al grupo 3'OH de una cadena de ADN rota con el uso de la desoxinucleotidil transferasa terminal. La intensidad de fluorescencia de cada

espermatozoide puntuado se determina como un "sí" o "no" para los espermatozoides en un portaobjetos de microscopio óptico o por canales de intensidad fluorescente en un citómetro de flujo. El AOT basado en microscopio óptico utiliza las propiedades metacromáticas del naranja de acridina para teñir los espermatozoides (Evenson y Wixon, 2006).

III.- HIPÓTESIS

El tiempo transcurrido desde la muerte del ovino hasta la obtención de espermatozoides de cola de epidídimo es directamente proporcional a la fragmentación de ADN.

IV.- Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar la fragmentación de ADN espermático de los espermatozoides tomados de cola de epidídimo a diferentes tiempos *post-mortem*.

4.2 Objetivos específicos

- Implementar la técnica de obtención de espermatozoides de cola de epidídimo de ovinos a diferentes tiempos *post-mortem* mediante lavado retrógrado epididimal.
- Realizar un espermiograma clásico a las muestras obtenidas de cola de epidídimo de bovinos a diferentes tiempos *post-mortem*.
- Determinar el porcentaje de células espermáticas que presenten fragmentación de ADN mediante la técnica naranja de metilo.

V.- Justificación

En la actualidad, se desarrollan técnicas de reproducción asistida las cuales buscan incrementar la producción de animales, así como la preservación de especies en peligro de extinción por lo que de suma importancia que se amplíe el estudio de este tipo de técnicas que permitan la obtención de material genético de buena calidad para aminorar costos de producción y aunado a esto mantener la diversidad genética.

VI.- Metodología

6.1 Obtención de muestras

Para el desarrollo experimental de este trabajo se utilizaron espermatozoides tomados de cola de epidídimo de 15 ovinos adultos, los cuales se obtuvieron del Rastro Municipal de Temamatla (Se localiza en el municipio de Temamatla, Estado de México, identificado en la zona de Camino Cuautitlán s/n, C.P. 56650. Es un rastro privado según registros de Senasica).

Una vez que los ovinos se sacrificaron, las muestras testiculares se transportaron y conservaron a 4°C en solución salina fisiológica por diferentes tiempos (24, 48 y 72 h), posteriormente se realizó la disección del conducto deferente y de la cola del epidídimo para obtener espermatozoides mediante lavado retrógrado epididimal de cada par de epidídimos.

6.2 Recolección y transporte de las muestras

Inmediatamente después de la orquiectomía del animal, se separaron los epidídimos de los testículos y se disecaron las caudas; ligando el paquete vascular y el conducto epididimario con hilo de algodón. Cada testículo fue limpiado con toallas de papel y se colocaron dentro de bolsas plásticas selladas con 20 ml de solución salina fisiológica y se identificaron con el número correspondiente al orden en que fueron recolectados indicando la fecha y hora exactas de la recolección.

6.3 Lavado retrógrado epididimal

El epidídimo ya separado del testículo, se colocaron en una caja Petri, a continuación, se localizó la porción más cercana de la zona media de la cola del epidídimo para realizar un corte transversal con el bisturí, antes que el diámetro del epidídimo se reduzca. Con la finalidad de obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles, se colocó una aguja de calibre según el diámetro interno de cada conducto deferente para (Benítez, 2017). Se adapta una jeringa (tipo “air-tite” de 5 ml) conteniendo 3 ml de medio Andersen y se perfunde lentamente dentro del lumen del vaso deferente. A medida que se perfunde el vaso deferente con el medio de lavado, se observa un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, aparece 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 (Amann et al., 1982).

6.4 Espermograma

El espermograma tiene como finalidad evaluar el semen y los espermatozoides, mediante parámetros cuantificables como vitalidad, motilidad y su concentración (Montoya, 2009).

- El porcentaje de espermatozoides vivos se puede determinar por varios métodos, siendo la coloración con eosina, el método más utilizado. Se mezclará una gota (10 μ L a 15 μ L) del semen con una gota del colorante con eosina al 0,5% en una lámina portaobjeto y se cubre con una laminilla, se deja reposar la muestra 30 segundos y se procede a contar 200 espermatozoides (coloreados y no coloreados), con una magnificación de 400X. Los espermatozoides vivos tienen su membrana intacta que impide la penetración del colorante, en tanto que los muertos adquieren la coloración (Montoya, 2009).

- La motilidad de los espermatozoides se evaluará en una muestra de 10 μL entre lámina y laminilla, por duplicado. Estandarizamos el volumen a usar y el tamaño de la laminilla (20x20 mm o 24x24 mm), de manera que para el análisis se utilice una muestra con una profundidad entre 25 μm y 30 μm , la cual garantiza el movimiento libre de los espermatozoides (Montoya, 2009).

Motilidad “a”: espermatozoides con motilidad progresiva rápida, a una velocidad de progresión $\geq 25 \mu\text{m}/\text{segundo}$ a 37°C , lo que equivale a la mitad de la cola en distancia o a 5 cabezas. Motilidad “b”: espermatozoides con motilidad progresiva lenta, a una velocidad de progresión entre 5 y $25 \mu\text{m}/\text{segundo}$ a 37°C , lo que equivale a la mitad de la cola en distancia. Motilidad “c”: espermatozoides con motilidad no progresiva. Motilidad “d”: espermatozoides inmóviles.

- Para determinar la concentración de espermatozoides por mL de semen y el recuento total, se utilizó el área central de la cámara de Neubauer. El número de cuadrados pequeños en los que se cuentan los espermatozoides depende de cada muestra (Montoya, 2009).

6.5.- Tinción de Naranja de Acridina para evaluar Fragmentación del ADN espermático

Se fundamenta en la fluorescencia verde que produce el fluorocromo naranja de acridina cuando se une al ADN de doble cadena y normal y fluorescencia roja cuando se une a ADN desnaturalizado (cadena sencilla). Se realizará de acuerdo a lo indicado por Sánchez et al (2005) mediante recuento manual del porcentaje de formas que presenta ADN fragmentado. El estado de ADN del espermatozoide es un indicador de potencial de fertilidad. Se extienden 10 microlitros de muestra espermática en un portaobjetos y se fija con etanol al 96% durante 20 minutos. La tinción de naranja de acridina se prepara en tampón-cítrico-fosfato a pH 3.5. Se tiñe durante 5 minutos y se

lava en agua destilada. Una vez seco, se procede a la lectura en microscopio de fluorescencia. Este recuento valora el porcentaje de fragmentación de ADN a 200 elementos.

VII.- Actividades Realizadas:

Se pudo realizar la recolección de muestras testiculares y se pudieron transportar hasta el laboratorio.

Se realizó el análisis seminal de las muestras.

Se obtuvieron resultados de los espermogramas de cada muestra analizada.

Se analizaron los resultados y se escribió el reporte.

Se pudieron realizar las tinciones de las muestras a excepción de las de fluorescencia

VIII.-Resultados

Tabla 1.-Porcentaje de espermatozoides vivos obtenidos de cola de epidídimo.

Tiempo postmortem	24 hrs	48 hrs	72 hrs
	88	76	56
	75	66	45
	96	86	78
	92	75	68
	89	67	79
Promedio y desviación estándar	88 +/- 7.9	74 +/- 8.09	65.2 +/- 14.62

Tabla 2.- Prcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva obtenidos de cola de epidídimo.

Tiempo postmortem	24 hrs	48 hrs	72 hrs
	76	70	50
	70	59	42
	87	78	73
	80	70	60
	83	62	72
Promedio y desviación estándar	79.2 +/- 6.53	67-8 +/- 7.50	59.4 +/- 13.56

En la tabla 1 y tabla 2 se puede observar de una manera clara, la disminución de tanto el porcentaje de espermatozoides vivos como de movilidad progresiva

durante su almacenamiento a 4 grados Celsius cuando aumenta el tiempo en los espermatozoides obtenidos a los diferentes tiempos postmortem.

IX.- Metas Realizadas

- Se obtuvieron y evaluaron 30 muestras espermáticas para observación y análisis de su calidad.
- Se entregó un reporte de servicio social donde se reportó todas las cuestiones básicas teóricas y prácticas del estudio.
- Se describió la técnica de obtención de espermatozoides epididimales mediante lavado retrogrado.
- Se cumplieron con 480 horas de servicio social de manera práctica en laboratorio.

X.- Bibliografía

1. Cunningham J. y Klein B. (2009): Fisiología Veterinaria. 4a ed., Elsevier, Barcelona.
2. Evenson DP y Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility, *Theriogenology*, 65(5), 979-991pp.
3. G.A. Monteiro et al. 2013. Effect of storage time and temperature of equine epididymis on the viability, motion parameters, and freezability of epididymal sperm. *J. Equine Vet. Sci.*
4. Gosálvez BJ, Caballero PP, López-Fernández C, Fernández JL., Núñez CR. 2008. Fragmentación del ADN espermático, *Revista Internacional de Andrología*, 6(3), 193-209pp.
5. Hafez E, y Hafez B. (2002): Reproducción e inseminación artificial en animales. 7a ed. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V., México.
6. Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herráez P and Anel L. 2003. Effect of epididymis driving conditions the quality of ram spermatozoa recovered postmortem. *Theriogenology*. 60(7):1249-59.
7. Perez E. H., 2009. Fisiología Animal, Universidad Nacional Agraria, Facultad de Ciencia Animal, 186-190.
8. Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M., and De Souza, F. F. 2013. Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 46(1), 31-38. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2014000100005>

9. Sánchez M, César M, Farré R, Magaña P y Aulesa C. 2005. Varicocele: fidiopatología y actualización diagnóstica desde el laboratorio. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 22(3), 261-267pp.
10. Sisson S, y Grossman J. (2001): *Anatomía de los animales domésticos*. 5a ed., Masson, S.A., Barcelona.
11. Tabarez A y Grajales H., Galina C. 2021. *Reproducción de los animales domésticos*. Capítulo 15. Ovinos. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
12. Tamayo-Canul J, Alvarez M, López-Urueña E, Nicolas M, Martinez-Pastor F, Anel E, Anel L and de Paz P. 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim Reprod Sci*. 126(1-2):76-82.