

Salinas Somoza, Natalia

Efecto de la trehalosa en la fragmentación del ADN en el espermatozoide bovino

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Salinas Somoza, N. 2014. Efecto de la trehalosa en la fragmentación del ADN en el espermatozoide bovino [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efecto-trehalosa-adn-bovino.pdf> [Fecha de consulta:.....]



UCA

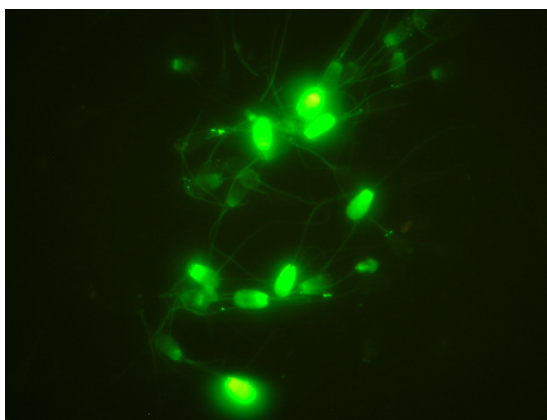
Facultad de Ciencias Agrarias

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

**“Efecto de la trehalosa en la fragmentación del ADN en el
espermatozoide bovino”**



**Trabajo final de graduación para optar por el título de:
Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: Natalia Salinas Somoza, N° de Registro: 05-090003-9

Profesor Tutor: Dra. Marina Sansiñena

Fecha: Agosto de 2014

Resumen

El objetivo de la siguiente investigación fue evaluar la fragmentación del ADN del semen bovino diluido y refrigerado a 5-7°C, como así también las variaciones que pueden observarse sobre el mismo indicador por efecto del agregado de trehalosa. Se establecieron así tres tratamientos: Control (temperatura ambiente), Refrigerado y Trehalosa. El análisis se hizo a través del tiempo, usándose como parámetros temporales: 0, 6, 12, 24, 48 y 72 hs. A través de este estudio se ha buscado conocer durante cuánto tiempo es posible utilizar una determinada muestra de semen refrigerado para un programa de IATF, sin que el ADN de la misma se vea deteriorado comprometiendo la tasa de concepción del mencionado programa. En cada tiempo y tratamiento se evaluó el nivel de fragmentación del ADN expresándose en forma de porcentaje. Los resultados obtenidos marcaron una tendencia ascendente para los tres tratamientos, mostrando diferencias significativas recién a partir de las 12 horas. En el tratamiento control a temperatura ambiente se observaron los mayores niveles de fragmentación mientras que en el tratamiento con trehalosa se observaron los niveles más bajos, en correlación con su acción criopreservante.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 El ADN del espermatozoide	
2.1.1 Organización estructural del ADN espermático	8
2.2 Apoptosis o Muerte celular	
2.2.1 La fragmentación del ADN	11
2.2.2 Mecanismos de fragmentación del ADN en espermatozoides	13
2.2.3 Metodologías para la evaluación de la fragmentación del ADN: Test de TUNEL	14
2.3 Criopreservación del material genético del esperma	
2.3.1 Metodologías empleadas para la criopreservación	17
2.3.2 Criopreservantes	17
2.3.3 La trehalosa	18
2.3.4 La trehalosa como criopreservante para el semen congelado	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Informe general del ensayo	24
3.2 Método de colección de los eyaculados	24
3.3 Diluyentes: materiales usados y metodologías de preparación	25
3.4 Muestra heteroespermática	26
3.5 Tratamientos realizados sobre el material	
3.5.1 Separación en tratamientos	26
3.5.2 Métodos de evaluación de la fragmentación del ADN	26
3.6 Diseño Experimental	34
3.7 Análisis estadístico	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSIÓN	38
6. CONCLUSIONES	40
7. ANEXOS	
7.1 Anexo: Protocolo de la técnica de TUNEL	41
7.2 Anexo: Planilla para el relevamiento de datos del conteo	43
7.3 Anexo: Imágenes del instrumental de laboratorio	44
7.4 Anexo: Imágenes de las muestras bajo la técnica de TUNEL	47
7.5 Anexo: Abstract del trabajo	50
7.6 Anexo: Análisis de la Varianza (ANOVA) del diseño estadístico	51

8. AGRADECIMIENTOS	52
9. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°1: Comparación de criopreservantes.....	18
Cuadro N°2: Efecto de la trehalosa sobre SOD, CAT, GSH-Px y GSH.....	22
Cuadro N°3: Medidas resumen del ensayo.....	36
Cuadro N°4: Efecto de trehalosa sobre la motilidad post congelado, integridad de la membrana acrosomal y membrana plasmática.....	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°1: Fragmentación dinámica del ADN.....	35
Gráfico N°2: Diferencias significativas entre tratamientos y tiempos.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Comparación entre Necrosis y Apoptosis celular.....	10
Figura N°2: Rutas de la Apoptosis.....	11
Figura N°3: Esquema de puntos de corte de las endonucleasas en el ADN.....	12
Figura N°4: Test de TUNEL a nivel del toroide de cromatina del espermatozoide.....	15
Figura N°5: Estructura química de la molécula de trehalosa.....	19
Figura N°6: Osmoprotección de las proteínas por efecto de la trehalosa.....	20
Figura N°7: Mecanismo de protección de la trehalosa a nivel de la membrana plasmática.....	20
Figura N°8: Esquema de manejo de los diluyentes durante las tareas a campo.....	25
Figura N°9: Diferentes presentaciones morfológicas de los espermatozoides.....	27
Figura N°10: Portaobjetos de 21 wells con las anotaciones correspondientes.....	28
Figura N°11: Estructura del Kit Roche.....	29
Figura N°12: Siembra de las muestras en los wells.....	30
Figura N°13: Esquema del modelo Nikon E200.....	32
Figura N°14: Esquema del diseño experimental del ensayo.....	34

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen N°1: Modelo de bucle “donut” de la cromatina del espermatozoide.....	9
Imagen N°2: Componentes del Kit de Roche.....	31
Imagen N°3: Aspecto de la solución de TUNEL.....	31
Imagen N°4: Montado final del material.....	32
Imagen N°5: Aspecto de los espermatozoides bajo los efectos del ensayo de TUNEL.....	33
Imagen N°6: Aspecto de los espermatozoides bajo los efectos del ensayo de TUNEL (flujo de luz interrumpido).....	33
Imagen N°7: Muestras en sus respectivos tubos de Eppendorf.....	44
Imagen N°8: Portaobjetos con 21 well.....	44
Imagen N°9: Solución PBS empleada para los lavados.....	45
Imagen N°10: Muestras en cámara húmeda.....	45
Imagen N°11: Aplicación de Vectrashield® H-100.....	46
Imagen N°12: Portaobjetos con muestras montadas listas para su conservación en freezer (-20°C).....	46
Imagen N°13: Tratamiento Control (72 hs).....	47
Imagen N°14: Tratamiento Control (72 hs) (Flujo de luz interrumpido).....	47
Imagen N°15: Tratamiento Refrigerado (72 hs).....	48
Imagen N°16: Tratamiento Refrigerado (72 hs) (Flujo de luz interrumpido).....	48
Imagen N°17: Tratamiento Trehalosa (72 hs)	49
Imagen N°18: Tratamiento Trehalosa (72 hs) (Flujo de luz interrumpido).....	49

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La criopreservación de células espermáticas se inicia a mediados del siglo XX utilizando glicerol como agente crioprotector (Polge y col., 1949).

La preservación del material genético del macho es un proceso complejo que requiere el mantenimiento de la calidad inicial del eyaculado y el manejo de la muestra a fin de evitar daños irreversibles a la célula espermática. Dentro de estos daños, el ingreso de la célula en la cascada de eventos que culmina con la apoptosis ha sido identificado como una de las razones para la reducción en la viabilidad celular, con consecuente pérdida de su poder fertilizante

La apoptosis o “autodestrucción de las células de forma programada” se produce cuando la célula activa su programa de suicidio codificado internamente como resultado de señales internas o externas. Las características morfológicas de la apoptosis incluyen el ampollado de la membrana plasmática, la condensación del citoplasma y la activación de una endonucleasa endógena (dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+}). La endonucleasa rompe al ADN generando mono y oligonucleosomas, múltiples discretos de una subunidad de 180 pares de bases (pb). A medida que estos fragmentos aparecen, se acumulan en el citoplasma de las células apoptóticas, hasta la ruptura de la membrana plasmática.

Este fenómeno de ruptura del ADN en múltiples subunidades es lo que se denomina “Fragmentación del ADN”. El análisis de esta anomalía, y más específicamente en la célula espermática, puede ser utilizado en reproducción animal para comprender hasta qué punto puede verse afectado el rendimiento de un programa de reproducción. Aún es incierto el origen de la fragmentación dinámica del espermatozoide, sin embargo, diversos estudios señalan una serie de causas posibles, como son: a) reemplazo de las histonas por protaminas durante la fase media de las espermatogénesis, lo que conduciría a un estrés en la cadena por efecto de una contorción intrincada de la misma (Marcon L., Boissonneault G., 2004), b) estrés oxidativo (Aitken R.J. y col. 1998), c) Rupturas apoptóticas de la cadena como en la células somáticas por efecto de las endonucleasas (Sotolongo B. y col. 2005).

Diversas técnicas de laboratorio (principalmente a través de tinciones y/o fluorescencias) permiten cuantificar el nivel de daño en el ADN espermático; la posibilidad de poder contar con este dato es de vital importancia dado que impacta de manera significativa sobre el grado de éxito que tendrá un determinado programa de reproducción, especialmente a nivel de la fertilización y posterior desarrollo embrionario, en el caso de éste último se sabe que el óvulo posee cierta capacidad para reparar el daño en el ADN del espermatozoide, dicha capacidad es limitada, por lo que a mayor daño, menores serán las posibilidades de supervivencia del embrión resultante (Muriel L., Segrelles E., Goyanes V., 2004; Fatehi A. N. y col. 2006).

Actualmente existen diversas técnicas de laboratorio que permiten detectar la fragmentación del ADN de las células espermáticas, dentro de las técnicas *in*

vitro se destacan el test de TUNEL (Terminal deoxynucleotidy transferase-mediated nick-end labelling), el test de ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), el test de Comet (Electroforesis en gel de agarosa) y el test de Dispersión de la cromatina del espermatozoide (SDC, Sperm chromatin dispersión). Se optó por el teste de TUNEL en éste trabajo dado que permite determinar presencia de fragmentación del ADN en células individuales, logrando así una medición cuantitativa.

En la búsqueda de la preservación de la integridad del material espermático durante su conservación en frío, se han empleado a lo largo de los años diversas sustancias crioprotectoras, definiéndose al crioprotector como sustancias muy solubles en agua y poco tóxicas. Normalmente se utilizan dos tipos de crioprotectores: penetrantes de membrana (glicerol y Dimetilsulfóxido (DMSO) y no penetrantes de membrana (azúcares, dextrano, etilenglicol, polivinilpirrolidona y almidón hidroxietilo) (FAO, 2001). Los primeros son sustancias de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta, mientras que los no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes (Boiso I., 2007).

La trehalosa, cuya denominación química es α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido, es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa. Dicho disacárido se encuentra presente en una amplia gama de organismos llevando a cabo funciones de reserva de energía y de protección ante el estrés abiótico. La trehalosa posee amplias aplicaciones biotecnológicas ya que protege proteínas y membranas biológicas, pudiendo utilizarse como preservador de alimentos, enzimas, vacunas, células, tejidos y órganos. Diversos estudios han señalado que la trehalosa posee la capacidad de proteger la estructura y función de las enzimas, así como la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo. Durante la protección de las proteínas, dicho azúcar forma una capsula alrededor de las mismas protegiendo su estructura terciaria (Lins y col. 2004). Por otro lado, también posee la capacidad de proteger las membranas celulares durante la deshidratación y enfriamiento impidiendo la separación en fases y posterior ruptura manteniéndolas en estado fluido (Crowe y col. 1984) (Ming T., y col. 2007).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Estudiar, por medio de la evaluación de la fragmentación del ADN bovino, la calidad del eyaculado bovino y su respuesta ante diferentes condiciones de criopreservación.

Objetivos particulares

- Comparar los niveles de fragmentación del ADN del semen bovino refrigerado, con y sin agregado de trehalosa.
- Determinar la ventana óptima de utilización del semen refrigerado bovino.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El ADN del espermatozoide

El ADN del espermatozoide de los animales mamíferos se encuentra extremadamente condensado, hasta seis veces más que el que se encuentra en el cromosoma mitótico. Gracias a sus componentes estructurales y organización específica tiene lugar dicha condensación extrema.

2.1.1 Organización estructural del ADN espermático

El empaquetamiento del ADN del espermatozoide difiere en varios aspectos del que se presenta en las células somáticas. La cromatina de las células somáticas está organizado en unidades discretas llamadas nucleosomas en las que aproximadamente 200 pares de bases de ADN rodean completando casi dos vueltas a un octámero de histonas (McGhee y Felsenfeld, 1980). Las series lineales que forman estos nucleosomas resultan en fibras de 10 nm que se enrollan de manera radial en hélices regulares para formar la fibra de 30 nm denominada *solenóide* (Marsden y Laemmli, 1979).

Durante la espermatogénesis la cromatina de los espermatozoides sufre un cambio significativo en su estructura, todas las histonas presentes en ellas son sustituidas en primer lugar por proteínas de transición y luego por protaminas (Meistrich y col., 2003). Estas protaminas condensan al ADN del espermatozoide con tal fuerza que lo hace resistente a los esfuerzos físicos que pueda sufrir como la centrifugación (Tateno y col., 2000), y la ebullición (Yanagida et al., 1991) dos tratamientos que destruyen el ADN en las células somáticas.

Como la función del espermatozoide es poder fusionar el genoma paterno en perfectas condiciones con el genoma contenido en el ovocito femenino, este tipo de condensación extrema lo protege durante su tránsito desde el macho a la hembra en la fecundación.

Para comprender como funciona esta organización estructural del ADN espermático, es necesario tener en cuenta cuatro cuestiones fundamentales:

- A. **Mecanismos de unión de las protaminas:** las protaminas compactan muy fuertemente al ADN a través de potentes uniones, de extremo a extremo, neutralizando completamente las cargas negativas de la doble hélice, transformando a la fibra en un polímero no cargado (Balhorn, 1982). Los estudios *in vitro* realizados por Vilfan, en el año 2004, sobre las protaminas del ADN espermático de toro han demostrado que la presencia de cisteínas en dichas estructuras colaboran con la estabilización de la cromatina espermática.
- B. **Reducción del super-enrollamiento:** Las histonas enrollan el ADN una vez cada 100 pb, generando así paquetes apretados. Sin embargo, se estima que las protaminas que enrollan el ADN lo hacen una vez cada

600 pb o menos (Ward, 1993), por lo que el ADN queda empaquetado con mayor fuerza, pero con un nivel de enrollamiento inferior.

- C. **Presencia de histonas en el espermatozoide maduro:** Algunos autores han demostrado que en los telómeros de cromosomas de espermatozoides existen algunas variantes de histonas (Zalensky y col., 2002). Otros han sugerido que los puntos de unión entre las histonas remanentes y la cromatina se da en sitios del bucle del ADN, denominados RAMs (regiones de anclaje a la matriz) (Wykes y Krawetz, 2003). Si bien no se sabe aún por qué existen partes de la cromatina de los espermatozoides que permanecen unidas a las histonas después del proceso de condensación, es importante tenerlo en cuenta porque el ADN que se une a las histonas es mucho más susceptible a los agentes que dañan el ADN que el ADN que se une a protaminas. Por lo tanto, el punto de unión entre la cromatina espermática y las histonas sería el *locus* susceptible a los daños que pueda sufrir el ADN (Shaman y Ward, 2006).
- D. **Estructura general de la cromatina:** La cromatina espermática está organizada en dominios de bucle por una matriz nuclear de los espermatozoides, de una manera similar a la de las células somáticas (Schmid y col., 2001; Sotolongo y Ward, 2000). En función de esto, en el año 2003, Sotolongo y Ward propusieron un modelo para la cromatina en el cual cada toroide (un solenoide de N vueltas doblado circularmente y de tal manera que se unan sus extremos) de protamina está unida por un conector o *linker* compuesto por cromatina, lo cual hace que la estructura general del polímero sea más sensible a agentes perjudiciales tales como la endonucleasa ADNasa I (Shaman y Ward, 2006) (Imagen 1).

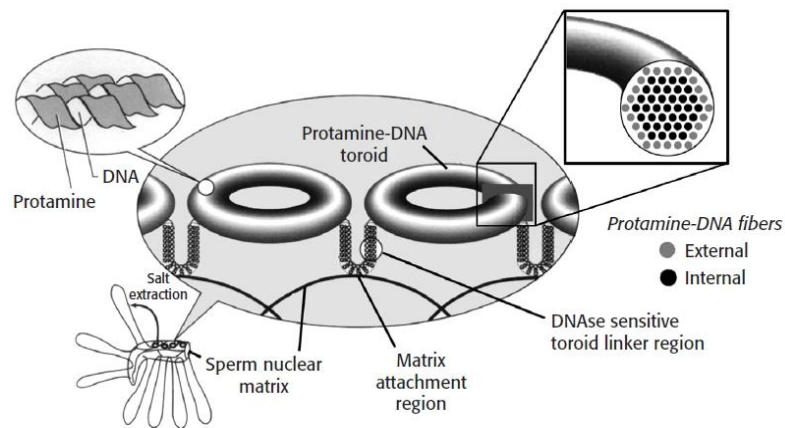


Imagen N° 1: Modelo de bucle "donut" de la cromatina del espermatozoide. Fuente: Tomado de "The Sperm Cell" (adaptado de Sotolongo y Ward, 2003).

Comprender la organización del ADN dentro del espermatozoide permite entender cuáles son los puntos más débiles y susceptibles al daño por efecto de agentes tanto internos como externos, daño que se traducirá en problemas que podrá acarrear la célula posteriormente y complicar su función reproductiva.

2.2 Apoptosis o muerte celular programada

El medio ambiente, el stress, variaciones bruscas de temperatura, diversos agentes patógenos son, entre otros, los principales factores que ponen en vilo la supervivencia de una célula.

El Dr. James Cunningham (2009) explica que el proceso de muerte celular producida por una lesión externa que implica inflamación celular, rotura y participación de la respuesta inflamatoria se denomina *necrosis*. Mientras que, por el otro lado, existe un proceso diferente, en el cual las células se encogen, el ADN se fragmenta de forma sistemática, se forman burbujas dinámicas en la membrana plasmática y la célula se rompe en trozos pequeños que son absorbidos rápidamente por las células vecinas. Ésta forma “ordena y limpia” de muerte celular se denomina *apoptosis*.

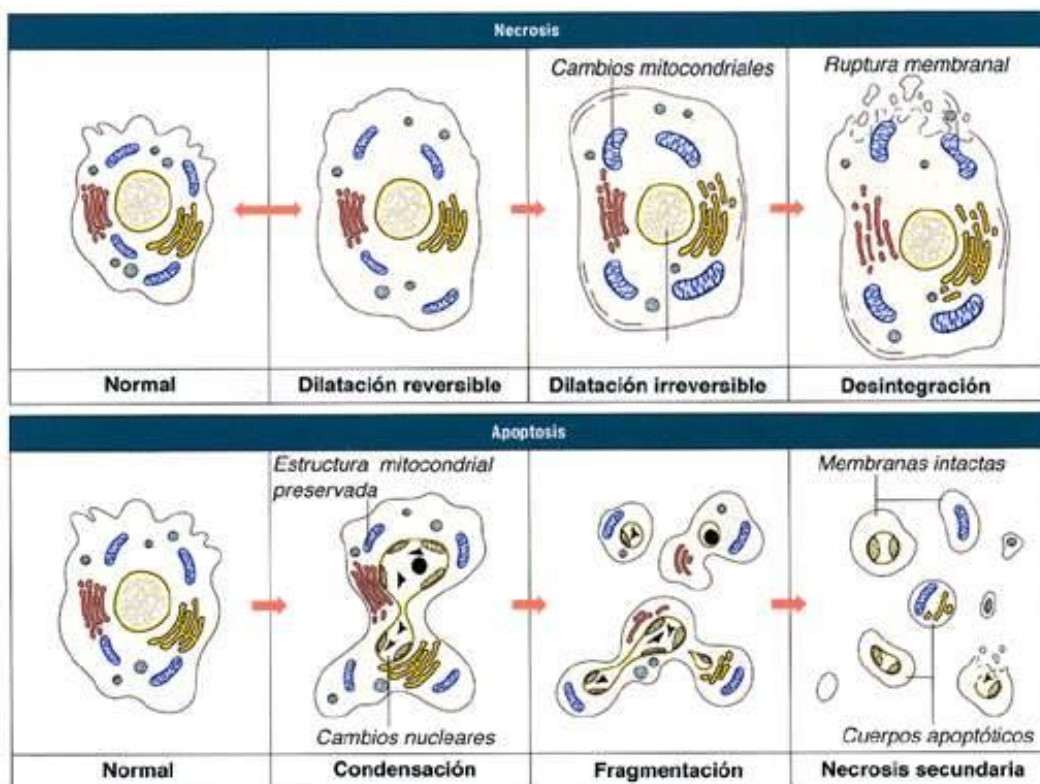


Figura N°1: Comparación entre Necrosis y Apoptosis celular. Fuente: <http://retina.umh.es>

A partir del descubrimiento del proceso de apoptosis durante los años 70, comenzó un recorrido científico para describir los caminos o vías que desencadenan el mencionado proceso. Fue así que lograron determinarse dos vías o rutas que dan lugar a la apoptosis. La denominada *ruta intrínseca de la apoptosis*, que responde a las lesiones internas o al stress procedente del interior de la célula, y la *ruta extrínseca de la apoptosis*, que comienza cuando una molécula de señalización se une a un “receptor de mortalidad” en la superficie celular (Figura 2). Ambas rutas convergen en los mismos “ejecutores”, unas enzimas proteolíticas que tienen un aminoácido cisteína en su sitio activo y

reciben el nombre de *caspasas*. Éstas enzimas se activan a sí mismas mediante la escisión proteolítica entre enzimas, existiendo así *caspasas activadoras* (responden directamente a uno u otro elemento de la ruta intrínseca o extrínseca) y *caspasas ejecutoras* (dan lugar a la escisión específica de las estructuras celulares). Entre otras tareas, las caspasas ejecutoras cortan a las proteínas del citoesqueleto, lo que hace que la célula reduzca su tamaño, y activan las enzimas que degradan el ADN, participando así en la fragmentación dinámica (Cunningham, 2009).

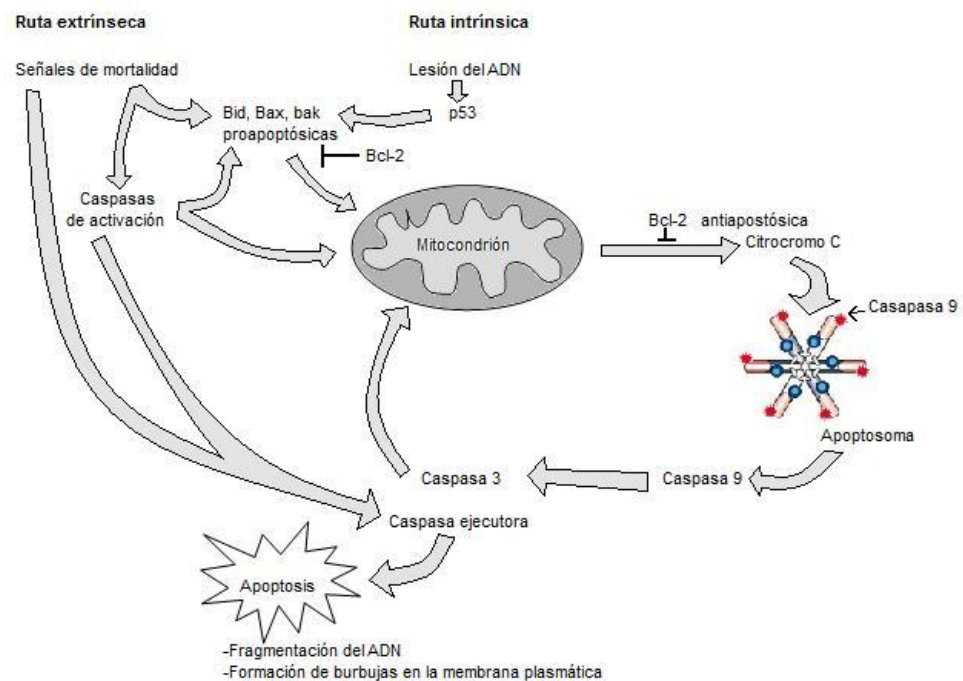


Figura N°2: Rutas de la Apoptosis. Fuente: Adaptado de “Fisiología Veterinaria” (4° Edición) Dr. James Cunningham

Dentro de los reguladores de la apoptosis, los genes de la familia de Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 genes) son los que están mejor estudiados. Bcl-2 es el prototipo de una gran familia de genes que codifica para una serie de proteínas que pueden inhibir (como las proteínas mitocondriales Bcl-2, Bcl-xL) o promover (Bax, Bak) la apoptosis. La proporción en que se expresen unas proteínas respecto a otras puede determinar que la célula sufra apoptosis o no.

2.2.1 La fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN es una consecuencia secundaria, en lugar de una causa integrante, de la apoptosis. Las endonucleasas involucradas, similares a la endonucleasa ADNasa I, son un indicio de que la fragmentación del ADN podría producirse después de la liberación de enzimas de lisis de la membrana citoplasmática, un evento que, potencialmente, podría ocurrir sólo después del

evento lítico final en la secuencia de apoptosis (Walker P. y col., 1994) (Figura N°3).

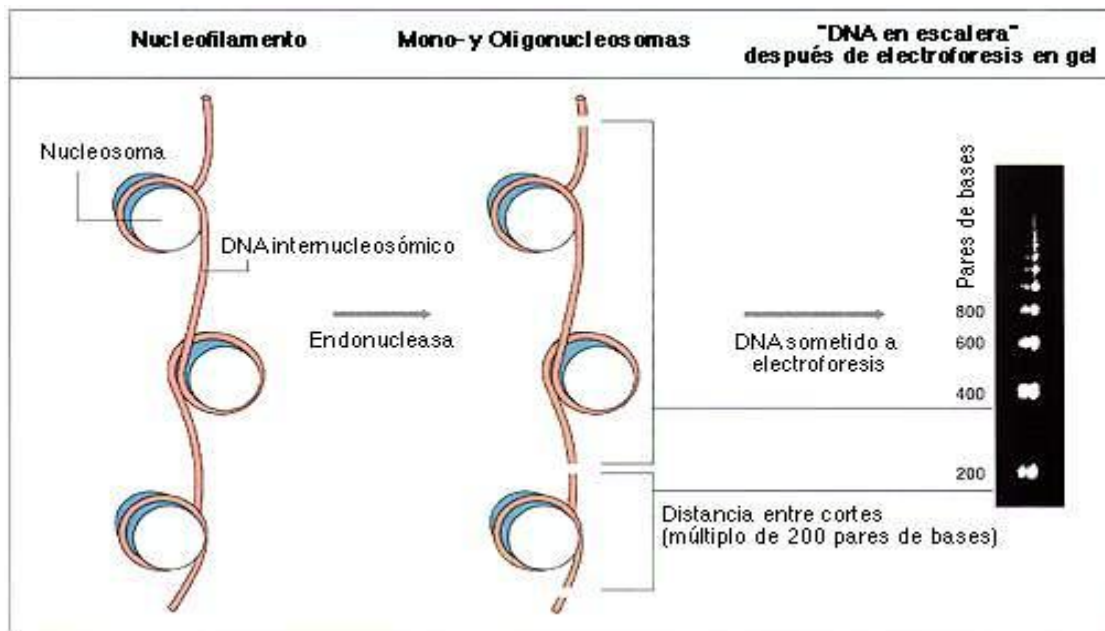


Figura N°3: Esquema de los puntos de corte de las endonucleasas en el ADN. Fuente: www.roche-applied-science.com

Más recientemente, los datos han mostrado que las proteasas específicas que residen en el citoplasma median los eventos terminales de la apoptosis, incluyendo los de la morfología nuclear. Aun así, la detección de la fragmentación del ADN y la presencia de extremos de cadena sencilla de ADN ha seguido siendo un ensayo usado en muchos estudios para detectar apoptosis en células, en particular en tejidos de aspecto intacto, dado que, a pesar del hecho de que la necrosis produce ADN de una sola hebra, puede terminar con los núcleos de las células (Pandey S. y col., 1994).

El mecanismo general de la fragmentación puede resumirse sencillamente en una primera etapa donde ocurre una rotura a gran escala por acción de las endonucleasas, obteniéndose fragmentos de entre 190.000 y 240.000 pares de bases. Seguidamente, estos fragmentos son atacados por otra endonucleasa y reducidos a fragmentos más pequeños, de 30.000 a 50.000 pares de bases. Finalmente, sobre estos últimos actúa un tercer grupo de endonucleasas, que se manifiestan dependiendo de los niveles intracelulares de Ca^{+2} y Mg^{+2} y se ven inhibidas por la presencia de Zn^{+2} y Ácido Aurín-tricarboxílico. Este último tipo de endonucleasas, similares a la ADNasa I, realiza cortes selectivos del ADN en puntos localizados entre los nucleosomas y origina fragmentos mono y oligonucleosomales de ADN constituidos por entre 180 y 200 pares de bases. Estos fragmentos de ADN revelan, en geles de agarosa, un patrón en escalera distintivo. Además de las endonucleasas, intervienen otras enzimas en la apoptosis, como transglutaminasas dependientes de Ca^{2+} , hidrolasas y proteasas. Para las endonucleasas y transglutaminasas los niveles de Ca^{2+} citosólico son determinantes. De hecho, las proteínas que se encargan de su movilización

(calbindina y calmodulina) sufren modificaciones en el proceso de apoptosis (Fernández, 2009).

2.2.2 Mecanismos de fragmentación dinámica del ADN en espermatozoides

A pesar del grado de condensación que presenta el ADN espermático, como se mencionó en puntos anteriores, sigue siendo susceptible a sufrir algún tipo de modificación a lo largo de su vida celular pudiendo esta modificación llevar a la muerte apresurada de la célula o provocar daños que, si bien no conduzcan a la apoptosis, si afectan posteriormente al embrión resultante de la fecundación.

El daño en el ADN de los espermatozoides puede impactar tanto en el ADN mitocondrial como en el nuclear, pudiendo ser inducido por cinco mecanismos principales:

- A. **Apoptosis durante el proceso de espermatogénesis:** A lo largo del proceso de espermatogénesis tienen lugar una serie de divisiones celulares que resultan en la inducción de apoptosis en un 50-60% de las células germinales que entran en meiosis. Estas células van a presentar un marcador apoptótico *Fas* para que puedan ser detectadas, fagocitadas y eliminadas por la célula de Sertoli a la que se encuentran asociadas (Sakkas y col., 1999). Sin embargo, no siempre esto ocurre, de modo que una célula germinal puede presentar un núcleo desintegrado por la apoptosis o ser aneuploide y el espermatozoide resultante tener una morfología normal (Burello y col., 2004).
- B. **Roturas de ADN durante el proceso de espermatogénesis:** Durante el proceso de espermatogénesis ocurre la remodelación de la cromatina espermática. Si durante dicho proceso se producen alteraciones, las mismas pueden derivar en la fragmentación del ADN. En la remodelación de la cromatina intervienen endonucleasas que provocan cortes en la cadena, mientras que sucede el reemplazo de las histonas por las protaminas, si durante el proceso de control de estas modificaciones acontecen alteraciones, se pueden dar roturas en la cadena que no podrán ser reparadas (McPherson y Longo, 1993).
- C. **Daño oxidativo:** Espermatozoides inmaduros en contacto con elevados niveles de radicales libres de oxígeno (o ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxigen Species) pueden desarrollar daños en su ADN (Ollero y col., 2001). El daño tendrá lugar luego de la espermiación, durante el traslado de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos a los tejidos del epidídimo, dado que éste tejido es susceptible a presentar un cierto nivel elevado de ROS (Tortolero y col., 2005). Estos pueden afectar directamente sobre el ADN o provocar la activación de endonucleasas y caspasas espermáticas (Twigg y col., 1998).
- D. **Fragmentación por activación de caspasas y endonucleasas espermáticas:** La activación de estos elementos puede deberse a factores

fisicoquímicos, como el aumento de la temperatura por encima de los 36°C (Álvarez, 2007).

- E. **Fragmentación del ADN inducida por radio y quimioterapia:** El mecanismo principal a través del cual la radiación ionizante produce daño celular es por fragmentación del ADN de cadena doble y oxidación del ADN por daño secundario mediado por el radical OH⁻ (Álvarez, 2007).

2.2.3 Metodologías para la evaluación de la fragmentación dinámica del ADN: Test de TUNEL

Existen una serie de ensayos o métodos que permiten la evaluación del nivel de daño en el ADN de los espermatozoides de un determinado individuo. Estos ensayos pueden ser *in vivo*, a través de la incorporación de nucleótidos que inducen a la muerte celular en una posterior incubación o *in vitro*, involucrando diversos reactivos que señalen el grado de daño, por medio de una reacción fisicoquímica particular (tinción, fosforescencia, separación, migración, etc.). Entre los Ensayos más comúnmente utilizados se destacan:

- TUNEL (TdT-mediated-dUTP Nick-End Labelling)
- COMET (Ensayo celular en gel por electroforesis)
- CMA₃ (Chromomycin A3 accessibility test) (Test por accesibilidad de la cromomicina A₃)
- DBD-FISH (DNA Breakage Detection Fluorescence In Situ Hybridization) (Detección de roturas en el ADN por hibridación *in situ*)
- SCD (Sperm Chromatin Dispersion test) (Test de Dispersión de la cromatina espermática)
- SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) (Ensayo de Estructura de la cromatina espermática)
- ISNT (In situ-nick translation)

La diferencia en la elección de un ensayo u otro radica primariamente en el paso previo a la ejecución de los mismos. Los ensayos de fragmentación dinámica de ADN como el COMET (a pH ácido o alcalino), SCD y SCSA requieren de un paso inicial de desnaturalización para detectar los fragmentos de ADN o roturas potenciales de cadena de ADN, mientras que por el contrario, los ensayos de TUNEL, ISNT y COMET (a pH neutro) no requieren de ese paso previo y miden roturas reales de ADN tanto de cadena sencilla como de cadena doble (Álvarez, 2007).

De todas las metodologías señaladas arriba por su disponibilidad y sencillez se eligió el ensayo de TUNEL para la realización del presente trabajo.

Propuesto en 1992, en el marco de la Jornada Internacional Oncológica, por el Dr. Gorczyca y su equipo, el ensayo de TUNEL se ha posicionado como una de las principales metodologías de laboratorio para detectar fallas y cortes a nivel del ADN. El ensayo de TUNEL se trata de una prueba basada en el “etiquetado” (*labelling*, en inglés) de los extremos 3'-OH con dUTP biotinilado y el uso de la Terminal deoxynucleotidyl transferasa (TdT) o ADN polimerasa.

Los polímeros que se originan producto de la fragmentación del ADN se ponen de manifiesto mediante microscopía de fluorescencia o se pueden detectar por técnicas inmunohistoquímicas (mediante el agregado de un anticuerpo).

En sus orígenes, el ensayo de TUNEL surgió como una herramienta más para la evaluación de la apoptosis en células somáticas. La asociación de los resultados positivos del ensayo TUNEL en el espermia eyaculado llevó a la idea de que aún los espermatozoides maduros pueden poseer la capacidad de seguir una vía apoptótica (Shaman y Ward, 2006).

Como se explicó en secciones anteriores dentro de este trabajo, la cromatina espermática presenta distintos tipos de puntos susceptibles a modificaciones o daños estructurales, es por esto que el punto principal de accesibilidad para el ensayo de TUNEL será las regiones de enlace entre los toroides de la cromatina (Shaman y Ward, 2006), dado que son regiones accesibles para la endonucleasa ADNasa I, por lo que deben serlo también para la TdT (Sotolongo y col., 2003) (Figura 4).

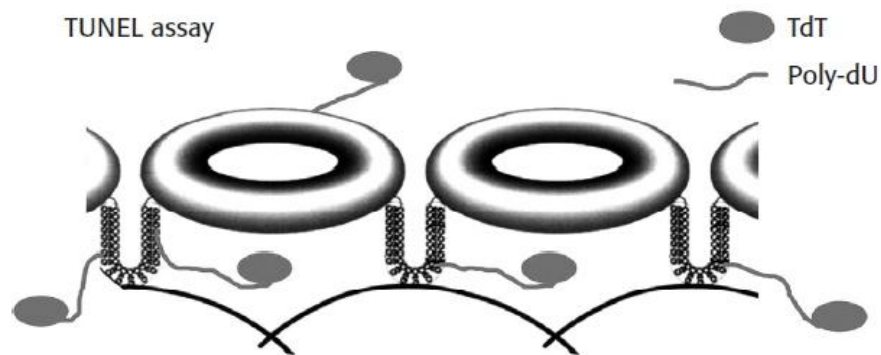


Figura N°4: Sitios susceptibles de ser marcados por el ensayo de TUNEL de acuerdo con el modelo de cromatina del espermatozoide organizada en toroides Fuente: Adaptado de “The Sperm Cell”

El TUNEL se limita a aquellas áreas de la cromatina espermática que permanecen accesibles a la modificación enzimática. Debido a que estas zonas pueden, de hecho, ser los sitios más activos durante las primeras horas de fertilización cuando se descondensa la cromatina espermática, este aspecto puede ser la razón por la cual el Test de TUNEL está más estrechamente relacionado con la detección de la infertilidad, especialmente en humanos (Sakkas y col., 2003).

2. 3 Criopreservación del material genético del esperma.

El objetivo de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a bajas temperaturas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares, dado que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo, pueden acontecer diversos problemas que pueden inducir a variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherentes en las células y tejidos a criopreservar (Álvila-Portillo y col., 2006).

Aplicar un determinado protocolo de criopreservación depende del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y/o tejido puesto que éste proceso está afectado por diferentes variables como la especie, tipo y estadio de la célula a congelar. Al presentar diferentes tamaños y diversas composiciones de solutos, la criopreservación de las células está inversamente correlacionada con la complejidad de los sistemas biológicos congelados (Boiso, 2007).

La membrana plasmática de la célula eucariota, independientemente de su composición, tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido. Estas membranas se componen básicamente de lípidos anfipáticos, proteínas y un pequeño porcentaje de hidratos de carbono que es variable de acuerdo al tipo y especie celular. Los lípidos determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. A su vez, durante el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afecta la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Mathews y col., 2003).

Las bajas temperaturas y la rapidez con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo, en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico (Mendoza y col., 2000). Los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde -133°C (vapores de nitrógeno no líquido) a -196°C (nitrógeno líquido). A estas temperaturas no ocurre el fenómeno de difusión ni hay energía suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas, por lo tanto, las dificultades de la congelación no surgen por la permanencia del material a temperaturas bajas, sino por los procesos de congelación y descongelación (Loken y Demetrik, 2005).

Señala la Dra. Ávila-Portillo (2006) que cada tipo celular debe ser congelado conociendo el perfil biofísico de la célula, el cual dictará mediante ensayos de permeabilidad y volumen osmóticamente inactivo con diferentes criopreservantes y/o soluciones criopreservantes, el mejor protocolo de criopreservación de esa célula. Es importante asegurar un sistema de seguridad en

el que se garantice el mantenimiento del nivel de nitrógeno líquido en los termos y ensayos de control de calidad por medio de pruebas de viabilidad previas a la utilización del material reproductivo.

2.3.1 Metodologías empleadas para la criopreservación

Las formas en que puede desarrollarse la criopreservación pueden ordenarse de acuerdo a la velocidad de congelamiento y descongelamiento. De esta manera se tienen:

- A. Procesos de congelación lenta- Descongelación lenta
- B. Procesos de congelación lenta- Descongelación rápida
- C. Procesos de congelación ultrarrápida
- D. Vitricación

En el caso del proceso que implica una congelación lenta y una descongelación rápida, se realiza la adición de un crioprotector por pasos y la curva de congelación se hace en un congelador programado. La descongelación rápida se hace a temperatura ambiente o a “baño maría” a 30°C para evitar la recristalización (Boiso, 2007).

En 1986 el Dr. Trouson describió la congelación ultrarrápida para la preservación de embriones. El procedimiento implica una rápida deshidratación celular, empleando altas concentraciones de un crioprotector, en general DMSO y Sacarosa, seguida de una inmersión en nitrógeno líquido (Boiso, 2007).

La vitricación se basa en el enfriamiento rápido en una mezcla de altas concentraciones de crioprotectores que, a bajas temperaturas, aumentan su viscosidad formando un sólido amorfo sin formación de hielo (Boiso, 2007).

2.3.2 Criopreservantes

Los criopreservantes pueden definirse como sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución determinada. El descenso de este punto implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de manera que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será inferior.

A nivel de su composición química, los criopreservantes pueden diferenciarse en tres tipos:

- A. Alcoholes (Metanol, Etanol, Propanol, 1-2 Propanediol y Glicerol)
- B. Azúcares (Glucosa, Lactosa, Sucrosa, Sacarosa)
- C. Dimetil sulfóxido (DMSO)

También pueden distinguirse entre agentes penetrantes y agentes no penetrantes de acuerdo a su capacidad de traspasar o no la membrana plasmática. El cuadro comparativo N°1, tiene por función detallar brevemente las diferencias entre ambos tipos.

	Criopreservantes	
	Penetrantes	No Penetrantes
Peso Molecular (Mr)	Bajo	Alto
Permeables a través de la MC	Sí	No
Forma de acción en la MC	Modula la estabilidad y fases de la bicapa fosfolipídica, como así también afectan a los procesos de solvatación del agua.	Ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular
Tipos	Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sacarosa, Glucosa
	Propanediol (PROH)	Dextrosa y Dextranso
Particularidades	El DMSO es el más usado por su acción crioprotectora, dado que se le atribuye la habilidad para prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento	Forman puentes de H con el agua, reduciendo la actividad del agua en una magnitud menor que la que se predeciría por su concentración molar (No obedecen la Ley de Raoult)

Cuadro N°1: Comparación entre criopreservantes

2.3.3 La trehalosa

Descrito por primera vez en 1832 por el Dr. Wiggers como un azúcar desconocido presente en el “Cornezuelo del centeno” (*Claviceps purpurea*). El mismo fue posteriormente encontrado en las pupas del escarabajo *Larinus maculata*, cuyo nombre común es “Trehala”, lo cual inspiró al químico Berthelot para designarlo como *trehalosa* (Singer y Lindquist, 1998).

Desde entonces, la trehalosa ha sido hallada en una gran variedad de especies, sobre todo los *anhidrobiontes*, un selecto grupo de organismos y microorganismos poco frecuentes, entre los que se incluyen las 'plantas de resurrección' (*Selaginella lepidophylla*), determinados camarones de salmuera, nematodos y la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*). Estos ejemplares son capaces de soportar la desecación casi total. Aguantan períodos largos en animación suspendida, pudiendo pasar de la inactividad a la actividad completa una vez que el agua vuelve a estar de nuevo disponible en el medio. Esta propiedad ha sido adjudicada a la presencia de la trehalosa en dichos organismos, facilitándoles la supervivencia en distintos medios, por lo que dicho elemento es apreciado para el almacenamiento de alimentos o materiales biológicos lábiles (Singer y Lindquist, 1998).

Si bien los beneficios saltan la vista, la pregunta es, ¿qué es la trehalosa? La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa (Mascorro y col., 2005). El enlace α , α -1,1 conecta los dos extremos reductores de los residuos de glucosa (Paiva y Panek 1996) anulando su poder reductor (Figura 5).

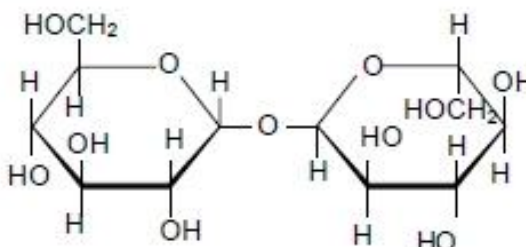


Figura N° 5: Estructura química de la molécula de trehalosa. Fuente: Adaptado de Singer y Lindquist, 1998

La biosíntesis de la trehalosa se puede dar por dos vías principales. En la primera intervienen dos enzimas: la trehalosa-P-sintasa (TPS) que produce trehalosa-6-fosfato (T-6-P) a partir de glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa, y la trehalosa-P-fosfatasa (TPP) que desfosforila a la T-6-P para transformarla en trehalosa (Cabib y Leloir, 1958). Esta vía se conoce como TPS/TPP. En la segunda, el sustrato es el azúcar maltosa en el cual el enlace α (1-4) es modificado a α (1-1) por la glicosil transferasa (GT), denominándose a esta vía como la vía TreS o GT (Tsusaki y col., 1996). Los procesos de inhibición/activación de las enzimas trehalosa-P-sintasa (TPS) y trehalosa-P-fosfatasa (TPP) se ven regulados a través de un control metabólico, por modificaciones en la carga energética citoplasmática y la concentración intracelular de AMP_c, dichas modificaciones tienen su origen en variaciones en las condiciones de los sustratos nitrogenados o carbonados (Aranda y col., 2004).

Las propiedades fisicoquímicas de la trehalosa ante la deshidratación y rehidratación explican el uso de éste azúcar en diversas actividades del área de la biotecnología. Frente a sus diversas aplicaciones ha demostrado:

- A. Capacidad para proteger y estabilizar la estructura y función de enzimas y la integridad de membranas biológicas bajo condiciones de stres abiótico extremo (desección, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radiación) (Crowe y col., 1984).
- B. Posee una gran estabilidad bajo condiciones extremas por efecto del enlace glicosídico que posee, equivalente a 4.184 kJ/mol. (Schiraldi y col., 2002).

Frente a las proteínas posibilita la osmoprotección de las mismas dado que al disminuir el agua, se forma una capa protectora de trehalosa que atrapa el agua disponible que queda en contacto con la proteína (Lins y col., 2004). Alrededor de la proteína se incrementan los puentes de hidrógeno entre trehalosa y agua y trehalosa y trehalosa (Elbein y col., 2003) (Figura 6).

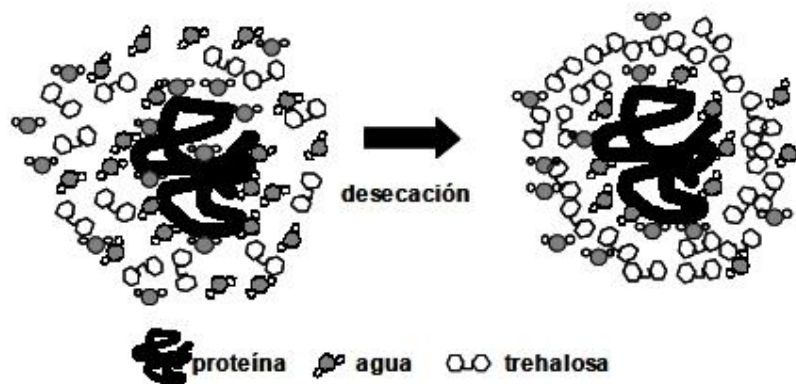


Figura N°6: Osmoprotección de las proteínas por efecto de la trehalosa. Fuente: Adaptado de Lins y col, 2004

La capacidad de la trehalosa para proteger las membranas celulares durante la deshidratación, por ejemplo para su posterior congelamiento y almacenamiento, radica en que interactúa con éstas favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando la fusión, la separación de fases y el rompimiento de las membranas plasmáticas (Crowe y col., 1984). Se cree que la trehalosa retarda la transición del líquido a gel mediante el reemplazo del agua por moléculas de trehalosa, manteniendo a las membranas en forma de cristal líquido (Crowe y col., 2001) (Figura 7).

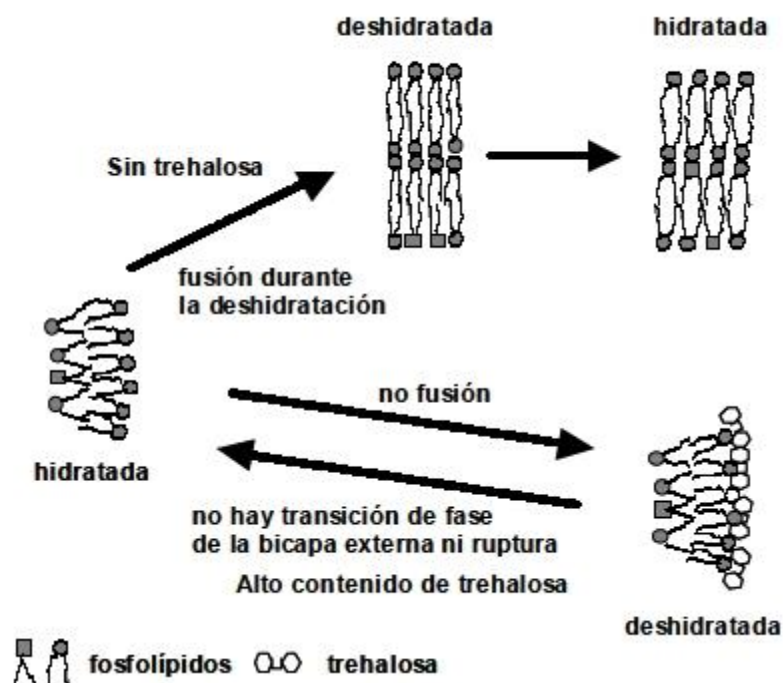


Figura N°7: Mecanismo de protección de la trehalosa a nivel de la membrana plasmática. Fuente: Adaptado de Lins y col, 2004

Como se mencionó anteriormente, las propiedades de la trehalosa la han vuelto un apreciado producto biotecnológico con diversas aplicaciones, encontrándose actualmente presente en cientos de productos. Los usos más frecuentes de la trehalosa son:

- Protector de la actividad enzimática, permite mantener a temperatura ambiente enzimas termolábiles como la ADN polimerasa (Colaco y col., 1992)
- Estabilizador y protector de moléculas complejas (Ej.: anticuerpos, sustitutos de sangre y hemoglobina) (Roser y Colaco, 1993) (Weisburd, 1988) (Brumfiel, 2004)
- Aditivos de diversos alimentos: se puede emplear en alimentos desecados o procesados como frutos y legumbres que mantienen mucho mejor sus aromas y propiedades organolépticas (Kidd y Devorak, 1994)
- Sustituto de azúcar: puede emplearse en panadería y en confitería para una mejor conservación de las propiedades de la masa horneada (Richards y col., 2002).
- Preservador de células, tejidos y órganos: en presencia de trehalosa mejora su supervivencia en comparación con otras sustancias (Sacarosa, Glucosa, etc.) (Eroglu y col., 2000; Guo y col., 2000).
- Osmoprotector de plantas ornamentales (Iwaya-Inoue y Takata, 2001)
- Osmoprotector en plantas transgénicas (Garg y col., 2002; Avonce y col., 2004)
- Marcador de selección en la producción de plantas transgénicas (Avonce y col., 2004)
- Uso en la industria de cosméticos (Higashiyama, 2002)
- Usos médicos y nutracéuticos (Katsuno y col., 2004)

2.3.4 La trehalosa como criopreservante para el semen congelado

La criopreservación aplicada a técnicas de preservación de material genético para su posterior utilización es una de las prácticas médicas y ganaderas más usadas en el mundo. Si bien su propósito es garantizar la supervivencia del semen, también puede ser la causa de daños irreversibles en la membrana plasmática, lo que conlleva la muerte de un gran número de espermatozoides o, en los supervivientes, cambios similares a los observados durante la capacitación espermática, que provoca un acortamiento de su período de vida útil (Hidalgo Ordóñez y col., 2005).

En función de los puntos anteriores, se puede decir que existen evidencias claras sobre la posibilidad de emplear a la trehalosa como un crioprotector para células que deban ser sometidas a cambios extremos en su entorno, como es el caso de someterlas a efecto de la deshidratación por congelación.

Llevado este planteo al plano de la preservación de muestras de semen para su posterior uso, como es el caso de la IATF, la trehalosa es un crioprotector no penetrante que ha mostrado ser capaz de proteger la estructura de la membrana del espermatozoide del daño oxidativo y golpe de frío durante el proceso de congelación-descongelación (Hu y col., 2010). Diversos estudios permiten llegar a esa conclusión, algunos señalaron la acción de la trehalosa para mejorar la acción antioxidante y reducir el estrés oxidativo provocado por la criopreservación (Aisen y col., 2005); mientras que otros reportaron que el tratamiento antioxidante con trehalosa elevó significativamente las concentraciones de vitamina E de los espermatozoides y la motilidad del espermatozoide mejoró (Bucak y col. 2007), también se demostró que la suplementación con trehalosa podría mejorar significativamente la calidad del espermatozoide y reducir la criocapacitación espermática (fenómeno que se puede generar por la pérdida de lípidos de la membrana plasmática durante la congelación y descongelación; (Thomas y col., 2005) y durante la criopreservación (Hu et al., 2009).

Señaladas las ventajas de la trehalosa como criopreservante para el semen, es importante destacar que, según los estudios realizados por Hu y sus colaboradores en el año 2010, la dosis máxima de trehalosa para la conservación de semen bovino, que es el de interés para este trabajo, radica en los 100 mOsm. Bajo esa concentración, se observaron los mejores resultados de motilidad espermática e integridad de la membrana acrosomal y membrana plasmática (Hu y col., 2010). El mismo estudio señaló que dosis superiores a los 100 mOsm reducen significativamente la actividad de los agentes antioxidantes presentes en los espermatozoides como son la glutinato peroxidasa, glutinato reductasa y catalasa; lo cual hace que las células sean más susceptibles a sufrir daños en sus membranas.

Parámetro	Control	Trehalosa 25 mOsm	Trehalosa 50 mOsm	Trehalosa 100 mOsm	Trehalosa 200 mOsm
SOD, U/ml	1.58 ± 0.08a	1.46 ± 0.11a	1.58 ± 0.07a	1.38 ± 0.09a	1.60 ± 0.10a
CAT, U/ml	2.01 ± 0.12b	2.25 ± 0.31b	2.19 ± 0.27b	3.17 ± 0.56a	3.06 ± 0.49a
GSH-Px, U/L	94.58 ± 12.47e	103.56 ± 15.66d	166.98 ± 19.13a	145.78 ± 18.17b	124.56 ± 14.21c
GSH, U/L	19.57 ± 2.36c	48.23 ± 3.14a	46.32 ± 3.68a	40.81 ± 2.97b	12.86 ± 2.81d

a-e Valores en el mismo rango con diferentes letras son significativamente diferentes

p< 0.05

Cuadro N°2: Efecto de la trehalosa en diferentes concentraciones sobre los niveles de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutinato peroxidasa (GSH-Px) y glutinato reductasa (GSH) en muestras heterogéneas de semen descongelado. Fuente: "Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen" (Hu y col., 2010)

En 2010, el Dr Hu y sus colaboradores concluyen que la eficacia que contiene la trehalosa puede estar relacionada con una acción antioxidante mejorada, que produce una mejor protección de las membranas. Ésta mejora en la

protección de las membranas es, sin duda, un valioso elemento a considerar para la preservación del material genético y reducir los fenómenos adversos como la fragmentación dinámica del ADN.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Informe general del ensayo

Las muestras de semen analizadas en este trabajo son provenientes de rodeo de toros de la raza Aberdeen Angus perteneciente al Centro del Altos Estudios Gándara (CAEG), ubicado en Verónica, partido de Punta Indio, provincia de Buenos Aires (a 138 Km de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires). Los análisis posteriores se realizaron en el laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias (UCA) y laboratorio de Patologías de Gametas y Embriones, REPROTEC.

La recolección de las muestras se realizó a través de 7 viajes a campo, entre el 11 de Agosto y el 22 de Septiembre del año 2011, obteniéndose eyaculados de cinco toros de fertilidad comprobada. El posterior análisis de las muestras en el laboratorio de fertilidad REPROTEC se realizó entre los meses de septiembre del año 2011 y febrero del año 2012.

Los eyaculados se obtuvieron en la manga, mediante el uso de un electroeyaculador. Las extracciones se realizaron casi semanalmente, permitiendo así un período mínimo de descanso de cinco días entre dos extracciones. Para la evaluación de los tratamientos se constituyó una muestra heteroespermática para eliminar el “efecto toro” de la variabilidad experimental.

Debido a la distancia entre la manga y el laboratorio del CAEG (aproximadamente 300 metros) se trabajó en un equipo de tres operarios: dos a cargo de la manga y una en el laboratorio para el análisis inmediato de cada muestra obtenida. En la manga, una de las personas se encargó exclusivamente de la manipulación de los animales y el electroeyaculador, mientras que la otra debía llevar la muestra al laboratorio en recipiente contenedor a 36°C. Previamente a la extracción se semen los animales fueron encerrados para la evaluación externa del aparato reproductivo (revisación testicular y peneana y recorte de pelos del prepucio).

3.2 Método de colección de los eyaculados

Previo a la colecta del semen, los animales fueron ubicados en la manga y, luego de introducir el toro en el cepo, se anotó su número de caravana. Una vez preparado y listo el electroeyaculador (ELECTROJAC IV), se procedió a evacuar del recto la materia fecal e introducir el transductor.

El electroeyaculador es un equipamiento diseñado para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma se produce la erección peneana y la eyaculación (Angelino Olivera, 2009). Al momento de la eyaculación se recogió la fracción del eyaculado rica en espermatozoides colocando el embudo con el tubo colector en la punta del glande del pene, y luego de sacar el tubo con el eyaculado del

recolector fue transportado inmediatamente al laboratorio del CAEG para su evaluación macro y microscópica.

3.3 Diluyentes: materiales usados y metodología de preparación

La cantidad de diluyente que se preparó fue de 600 ml, de los cuales 200cc se prepararon con trehalosa (para el tratamiento T) y 400 ml sin trehalosa para los tratamientos control y refrigerado (C y R).

Como diluyente se empleó Triladyl®, un buffer que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, glicerina, agua destilada y antibióticos (Minitüb, Alemania), con la adición de agua bidestilada apirógena y yema de huevo de gallina, en una proporción 1:3:1. Los 400 ml de solución sin trehalosa se prepararon con 80 ml de Triladyl®, 240 ml de agua y 80 ml de yema de huevo de gallina. A los otros 200 ml, compuestos por 40 ml de Triladyl®, 120 ml de agua y 40 ml de yema se le agregaron 150 mOms de trehalosa. Se colocaron los diluyentes en tubos Falcon de 50 ml y se almacenaron en el freezer a -80°C hasta el momento de su utilización.

En el laboratorio de campo se utilizaron 15 tubos de ensayo, rotulados según los tratamientos: T (Refrigerado + Trehalosa), R (Refrigerado) y C (Control) y con numeración de 1 a 5. Luego, fueron colocados con una pipeta electrónica 3 ml de diluyente solamente para los tratamientos R y C y 3 ml, en los tubos T de diluyente con trehalosa. Una vez llenos, los tubos fueron introducidos en baño maría a 35-37°C a la espera de los eyaculados (Figura 8).

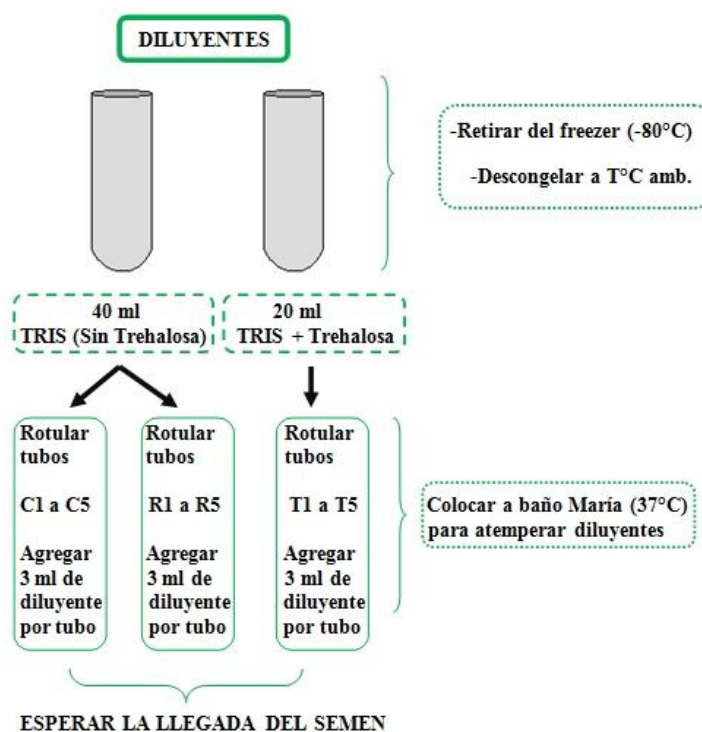


Figura N°8: Esquema de manejo de los diluyentes durante las tareas a campo.

3.4 Muestra heteroespermática

Como se mencionó anteriormente, para este trabajo se constituyó una muestra heteroespermática de modo tal de reducir el “efecto toro”.

Se realizó un análisis preliminar macroscópico de volumen, color y densidad. Según su densidad, el semen puede clasificarse como acuoso, lechoso, lechoso cremoso y cremoso, estando relacionado directamente con su concentración espermática (Gómez y Migliorisi). Se consideró muy bueno cuando es cremoso espeso (750.000 a 1 millón o más de espermatozoides/mm³), bueno cuando es lechoso (400.000 a 750.000 esp/ mm³), regular cuando es lechoso aguachento (250.000 a 400.000 esp/ mm³) y pobre cuando es translúcido (menos de 250.000esp/ mm³). A su vez, se realizabó una observación en búsqueda de “cuerpos extraños” que pudieran indicar algún tipo de anomalía.

Luego del examen macroscópico, se procedió a colocar 1 ml de eyaculado puro del toro 1 en los tubos C1, R1 y T1, repitiéndose el procedimiento a medida que llegaban los eyaculados de los demás toros. Una vez obtenidos, evaluados y fraccionados los 5 eyaculados, se procedió a realizar el pool heteroespermático. Se colocaban los contenidos de los tubos de ensayo C1 a C5 en un tubo Falcon de 50 ml y se hizo lo mismo con los tubos R y T.

3.5 Tratamientos

3.5.1 Separación en tratamientos

A partir de este momento, el material obtenido fue dividido y sometido a tres tratamientos diferentes:

- Control (C): muestra mantenida sin refrigeración, a temperatura ambiente (18-22°C).
- Refrigerado (R): muestra mantenida refrigerada en heladera controlada entre 5 y 7°C.
- Trehalosa (T): muestra mantenida refrigerada en heladera controlada entre 5 y 7 °C.

3.5.2 Métodos de evaluación de la fragmentación del ADN

En todas las ventanas de evaluación (0, 6, 12, 24, 48, 72) se ponderaron los parámetros de viabilidad microscópicos motilidad masal (MM), motilidad individual progresiva (MIP) y porcentaje de vivos (%vivos) mediante tinción con eosina (Ver “Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino”, Alejandro Rossi, 2012).

En la segunda instancia de trabajo (desarrollada en la presente tesina), se procedió a fijar las muestras para posteriormente someterlo al ensayo de TUNEL (TdT-mediated-dUTP Nick-End Labelling) a fin de poder evaluar los niveles de

fragmentación del ADN en función del tiempo de almacenaje. La tasa de fragmentación de ADN surge del recuento de los espermatozoides dañados en relación a aquellos que no exhiben daño evidente.

La observación microscópica de la población de espermatozoides permitió apreciar diferentes disposiciones y morfologías adoptadas (Figura 9):

- a) Cabeza y cola unidas (Espermatozoide de apariencia sana y normal)
- b) Cabeza y cola separadas
- c) Cola enrollada
- d) Cabeza con alguna deformación (achatamiento, contracción, fusiforme)
- e) Cuello del espermatozoide deforme no recto
- f) Doble cabeza
- g) Cabeza normal pero dos colas

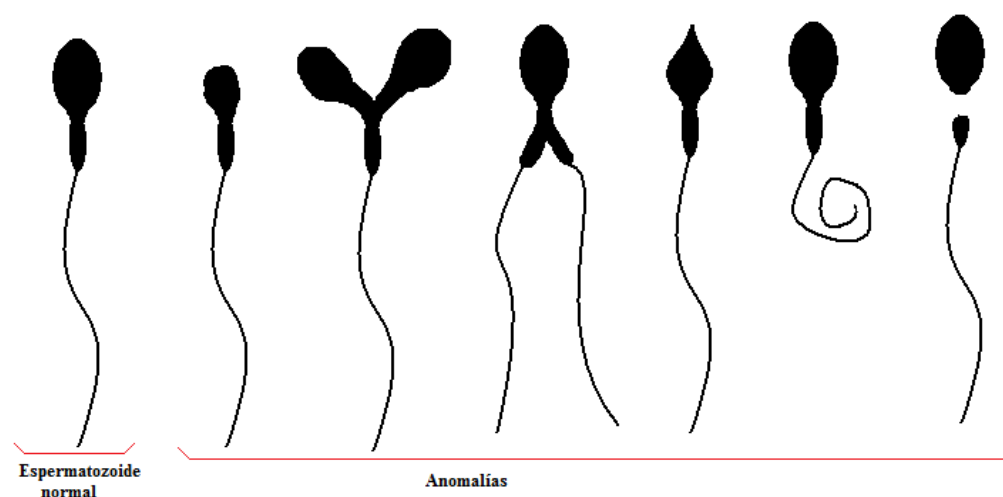


Figura N°9: Diferentes presentaciones morfológicas de los espermatozoides.

En el presente ensayo, sólo se incluyeron en el recuento para el cálculo de tasa de fragmentación de ADN a aquellos espermatozoides que presentaron cabeza (periforme) unida a su correspondiente cola, considerado a fines de este experimento, un espermatozoide de morfología “normal”. Todos aquellos espermatozoides que presentaron anomalías no fueron incluidos.

Para poder comenzar a trabajar, el material, dispuesto en tubos Eppendorf de 5 ml, fue retirado del frío (5-7°C) para exponerlo a temperatura ambiente (20°C), con el fin de que, con el correr de los minutos, adquiriera el estado líquido que permitiera continuar trabajando con el mismo.

Mientras las muestras realizaban el intercambio calórico necesario para adquirir una liquidez similar al material en su estado natural, se preparó el instrumental necesario para el desarrollo de la técnica de TUNEL. Por cada réplica se empleó un portaobjeto con 21 wells (pocillos) (Figura 10) que previamente fueron tratados con 30 µl de Poly-lisina por well, al menos dos horas previas a la siembra de muestras. La Poly-lisina tiene por función permitir la adherencia de las células al portaobjetos.

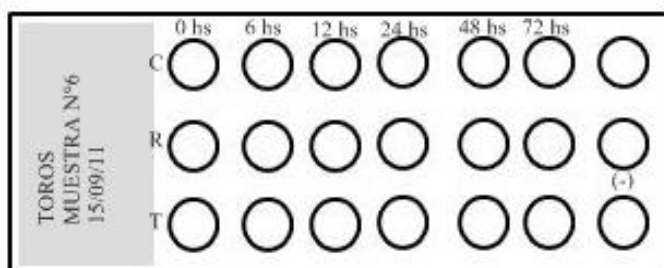


Figura N°10: Portaobjeto de 21 wells con las anotaciones correspondientes.

En el caso de la especie bovina, no se consideró necesaria la centrifugación de la muestra a fin de aumentar la concentración de trabajo. Por consiguiente, únicamente se realizó una cuidadosa resuspensión.

Para el desarrollo de la técnica de TUNEL (TdT-mediated-dUTP Nick-End Labelling) se empleó el Kit Roche o *In Situ* Cell Death Detection Kit® (Kit de Detección de muerte celular *in situ*). El kit se compone de una solución buffer con enzima (Desoxinucleotil transferasa), solución etiquetadora (mezcla de nucleótidos en reacción buffer) y convertidor POD (Anticuerpo anti-fluoresceína con peroxidasa de rábano picante (POD)). El principio del kit se basa en que la escisión de ADN genómico durante la apoptosis puede producir fragmentos de ADN de bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas), así como roturas de cadena simple ("nicks") en el ADN de alto peso molecular. Estas roturas de cadena de ADN se pueden identificar mediante el etiquetado libre de extremos 3'-OH con nucleótidos modificados en una reacción enzimática. El etiquetado se produce a través de las siguientes etapas:

1. El etiquetado de filamento de la DNA a través de la ruptura realizad por la Terminal transferasa desoxinucleotidil (TDT), que cataliza la polimerización de nucleótidos marcados para liberar el extremo 3'OH del (reacción TUNEL).
2. La fluoresceína incorporada es detectada por el anticuerpo anti-fluoresceína, a través de los fragmentos Fab (de origen ovino), conjugados con la peroxidasa de rábano picante (POD).
3. Después de la reacción del sustrato, las células teñidas pueden ser analizadas bajo la luz del microscopio.

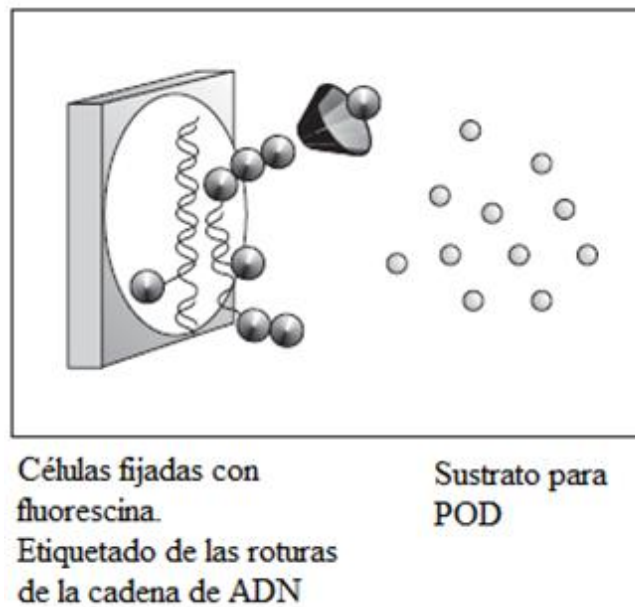


Figura N°11: Estructura del Kit Roche. Fuente: lifescience.roche.com

El kit está diseñado para detectar y cuantificar la muerte celular apoptótica a nivel de células individuales en células y tejidos. Por lo tanto, se puede utilizar en muchos sistemas de ensayo diferentes, como por ejemplo:

- La detección de células apoptóticas individuales en las secciones de tejidos fijados en formol y congelados en la investigación básica y patología de rutina.
- Determinación de la sensibilidad de las células malignas a la apoptosis inducida por drogas en la investigación del cáncer y oncología clínica.
- La tipificación de las células que experimentan muerte celular en poblaciones heterogéneas por procedimientos de doble tinción.

Por su practicidad en el uso y brindar la posibilidad de detectar células con muerte celular por vía apoptótica se eligió el *In Situ* Cell Death Detection Kit® de Roche para el tratamiento de las muestras en el presente trabajo.

Seguidamente al atemperado, resuspendido y conteo de las muestras, se procedió al fijado de las mismas en el portaobjeto de 21 wells, ubicando cada tiempo y tratamiento en cada well correspondiente, ubicando en por filas los tratamientos y por columna los tiempos, como se muestra en la siguiente figura:

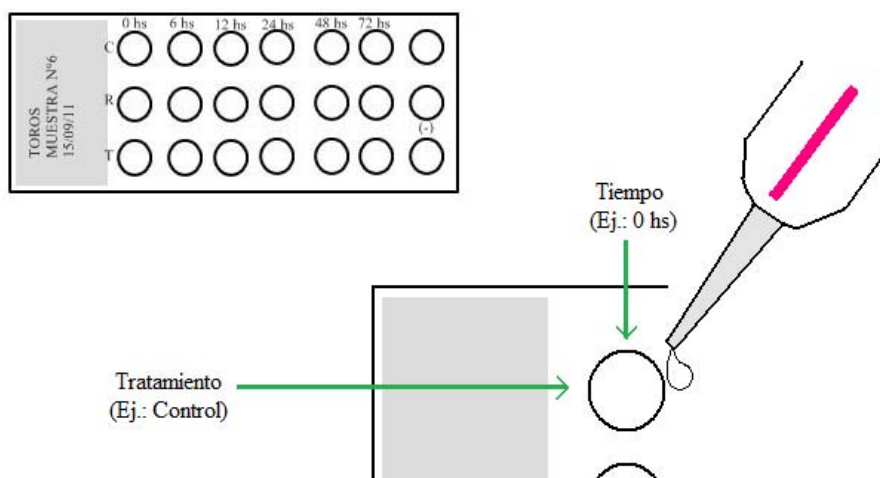


Figura N°12: Siembra de muestra en well.

Cada muestra fue colocada con ayuda de una pipeta (Figura 12), ajustada para movilizar sólo 30 µl y descartando una punta por muestra para evitar la contaminación de las mismas. Al final, se repitió la siembra de la última muestra, de manera de generar un control negativo. Las muestras sembradas fueron incubadas durante una hora reloj en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Luego se absorbió el exceso de muestra con ayuda de pequeños trozos de papel tissue (cuidando de no tocar el fondo del well, empleando uno por well), de modo tal que sólo quede una delgada película adherida al fondo del well. Cada muestra fue lavada con PBS (Phosphate buffered saline; Solución buffer salina de fosfato). Una vez retirado los excesos de muestra, la misma fue fijada con 5 µl de Metanol frío (T=-20°C) como como anticongelante.

Posteriormente se colocó una solución de bloqueo, compuesta por Albúmina sérica bovina (BSA) al 4% w/v en PBS (La solución de bloqueo se emplea para inhibir el desarrollo celular). Dado que contiene globulinas, especialmente las γ-globulinas, es necesario llevar a cabo la inactivación de las mismas sin afectar a los polipéptidos. Se dejaba reposar por un periodo de 20 a 30 minutos. Luego, la solución de bloqueo era absorbida con ayuda de un papel tissue, cuidando nuevamente de no tocar el fondo de cada well.

La solución de TUNEL fue preparada siguiendo el siguiente criterio: 1 µl de enzima + 9 µl de solución Label. De la composición resultante, se empleó 5 µl/well, por lo cual se preparó por cada vez que realizaba el ensayo un total de 95 µl de solución de TUNEL (9,5 µl de enzima + 85,5 µl de solución Label), colocados en un tubo de Eppendorf de 5 ml (Imagen 3). Una vez que la solución era colocada en los well, se llevó el portaobjetos con el material a incubar a 37°C durante una hora. No se hizo uso del anticuerpo que usualmente incluye el kit dado que, para el presente trabajo, se optó por la realización de una microscopía de fluorescencia para la detección de células apoptóticas, en lugar de una detección a través de técnicas inmunohistoquímicas.



Imagen N°2: Componentes del Kit de Roche.

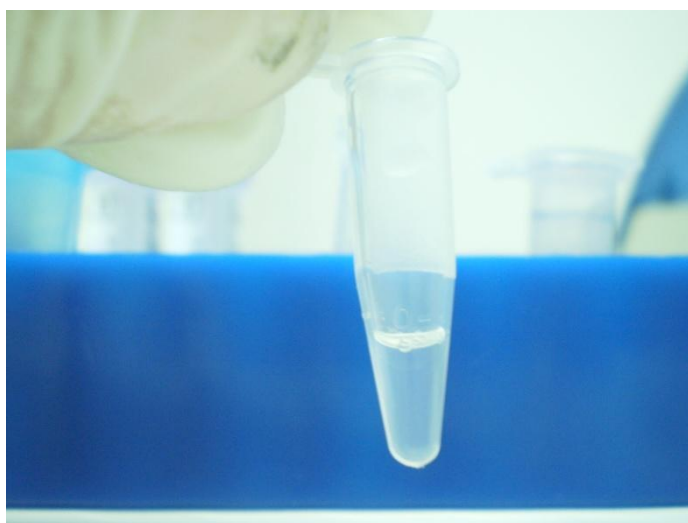


Imagen N°3: Aspecto de la solución de TUNEL.

Pasado el tiempo de incubación y una vez retirado el portaobjetos de la incubadora, cada muestra se lavó con PBS 6 veces y, finalizado el último lavado, se dejó secar sobre una platina a 37°C.

Una vez seco, se procedió al montaje con Vectashield® H-100, un medio de montaje acuoso a base de glicerol que no solidifica, y luego se cubrió el portaobjetos con un “coverslip” (un delicado cubreobjetos cuya finalidad es proteger el material de una posible contaminación), el mismo fue sellado con esmalte para uñas.

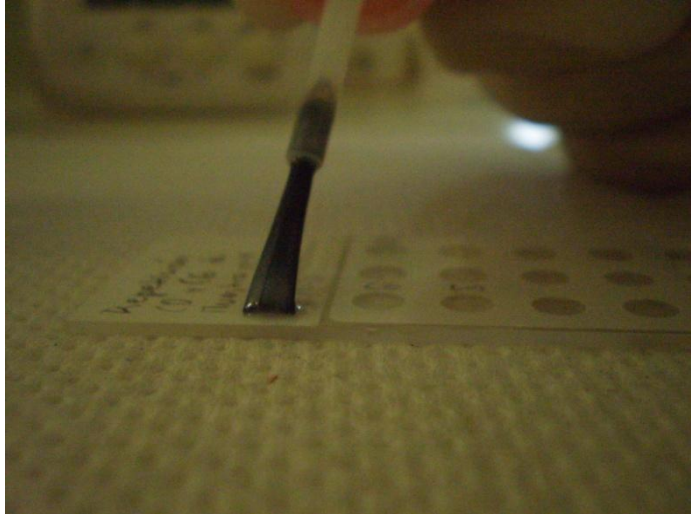


Imagen N°4: Montado final del material.

El material así conservado fue llevado al freezer, siendo un tiempo mínimo de espera para realizar la primera lectura al microscopio de 24 horas. Pasadas las 24 horas que sugiere el fabricante del kit como tiempo prudencial de espera para que el material esté correctamente fijado y permita su lectura a microscopio, se procedió a la misma. Para este trabajo se empleó un microscopio Nikon eclipse e200, diseñado para la visualización de tinciones de inmunofluorescencia.



Figura N°13: Esquema del modelo Nikon E200. Fuente: www.microscopyu.com

Sólo se tuvieron en cuenta en los conteos aquellos espermatozoides de aspecto normal, con cabeza periforme unida a la cola por un cuello fácilmente distinguible y con la cola extendida (sin enrollamientos bruscos). La base de conteo fue de 100 espermatozoides, haciéndose dos conteos como mínimo (en total 200 espermatozoides), sin embargo, si entre el primer conteo y el segundo

había una diferencia mayor a un 2%, se debía realizar un tercer conteo, o los necesarios, hasta que la diferencia entre ellos fuera menor al 2%. Los espermatozoides considerados como positivos para la reacción de TUNEL fueron aquellos que mostraban más del 90% de la cabeza teñida de coloración verde fosforescente, brillando con intensidad cuando era interrumpido el flujo de luz del microscopio.

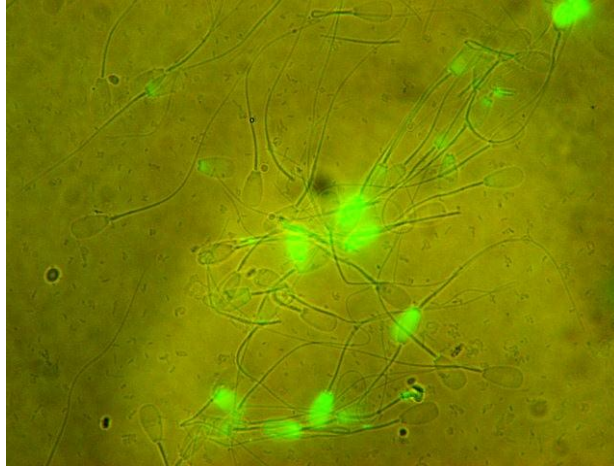


Imagen N°5: Aspecto de los espermatozoides bajo los efectos del ensayo de TUNEL. Las cabezas teñidas son positivas a la reacción. (Fotografías tomadas con un objetivo de 40x).

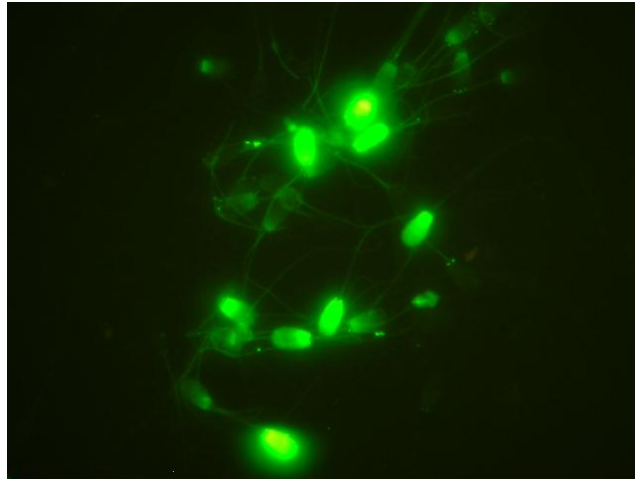


Imagen N°6: Aspecto de los espermatozoides positivos a la reacción de TUNEL cuando el flujo de luz del microscopio era anulado. (Fotografías tomadas con un objetivo de 40x).

3.6 Diseño Experimental

A continuación la Figura 14 se muestra de manera simplificada el diseño experimental del ensayo.

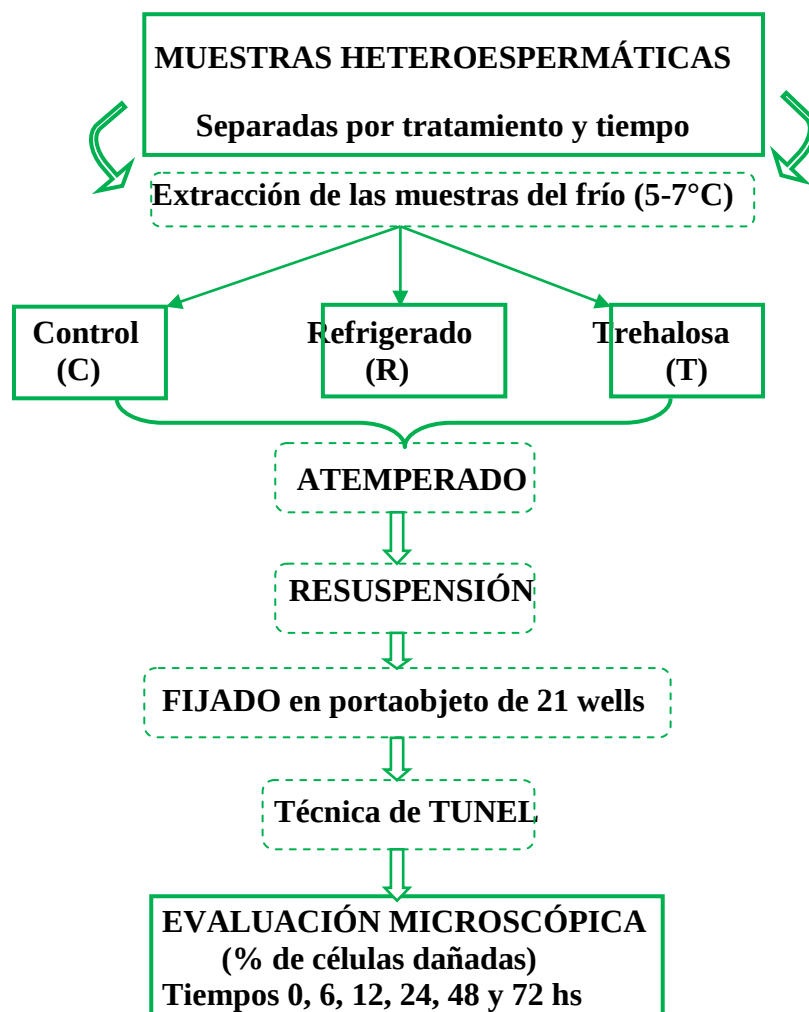


Figura N°14: Esquema del diseño experimental del ensayo.

3.7 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de los datos obtenidos en el ensayo con el software estadístico *Infostat* (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008). *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para realizar el análisis se utilizó un diseño en parcelas divididas.

4. RESULTADOS

La siguiente sección cuenta con tablas y figuras de los resultados obtenidos en el ensayo.

En el Gráfico 1 se indica la variación de la fragmentación del ADN (medida en porcentaje de espermatozoides dañados que tiene reacción positiva al ensayo de TUNEL) en las distintas horas de evaluación, y las diferencias de valores entre tratamientos.

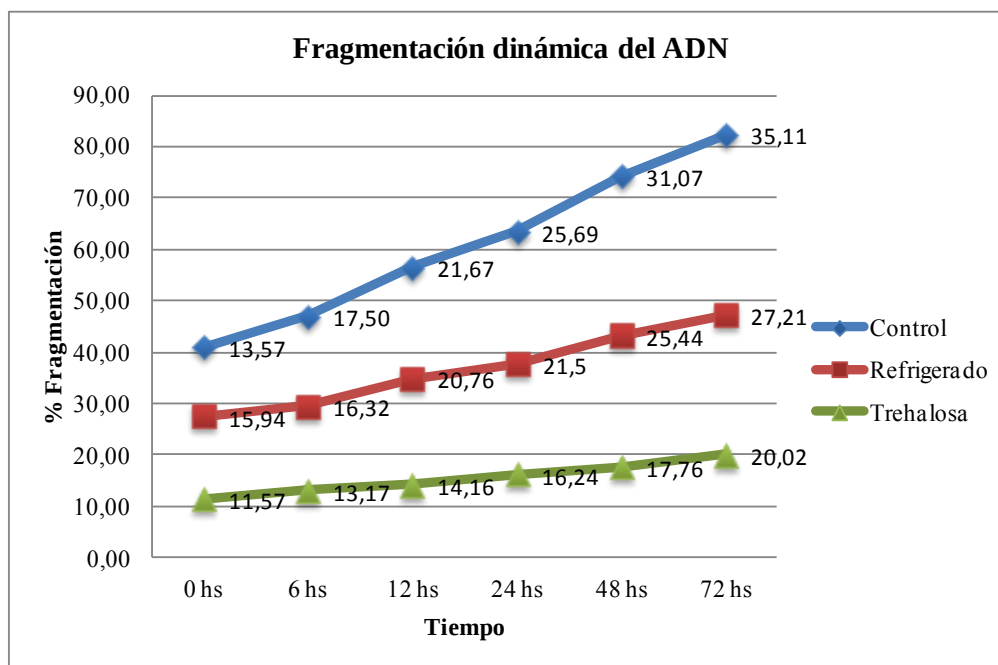


Gráfico N°1: Fragmentación dinámica del ADN

La tendencia del ensayo indica que el tratamiento con trehalosa presenta los valores más bajos de fragmentación de ADN desde el comienzo (hora 0), con un ligero aumento a lo largo del tiempo. Los tratamientos Control y Refrigerado muestran valores con escasas diferencias hasta las 12 hs, aumentando marcadamente en el tratamiento Control, mientras que en el caso del Refrigerado la curva muestra un mayor aumento a partir de las 24 hs.

En la Cuadro N°3 se presentan las medidas resumen del ensayo para cada tratamiento y momento particular. Las medidas son: media, desvío estándar, coeficiente de variación, valor mínimo y máximo.

% Fragmentación Dinámica						
Tratamiento	Tiempo (hs)	Media	D.E	C.V	Mín.	Máx.
Control	0	13,57	3,18	8,69	11,33	20
	6	17,5	1,46	1,82	17,67	20
	12	21,67	3,45	10,21	17,5	25,5
	24	25,69	4,88	20,45	18,33	33,5
	48	31,07	5,14	22,64	28,5	40,33
	72	35,11	7,78	51,85	25,67	45,67
Refrigerado	0	15,94	4,68	18,75	12	24
	6	16,32	4,64	18,48	11	21,25
	12	20,76	5,96	30,4	15	28,33
	24	21,5	6,91	40,9	15,33	34,5
	48	25,44	7,88	53,17	17	39
	72	27,21	8,85	40,18	20,5	40,33
Trehalosa	0	11,57	3,39	9,83	7	16,5
	6	13,17	3,19	8,73	7,33	16
	12	14,16	3,57	10,92	9,5	20,33
	24	16,24	4,11	14,48	13	22,67
	48	17,76	4,42	16,75	12,33	23,33
	72	20,02	4,95	20,97	13,75	24,67

Cuadro N°3: Medidas resumen del ensayo

En el Gráfico 2 las barras se disponen indicando las diferencias significativas detectadas en los valores de fragmentación dinámica del ADN, entre tratamientos y tiempos. Las diferencias se estimaron a través de un ANOVA con la prueba de Tukey, en donde distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

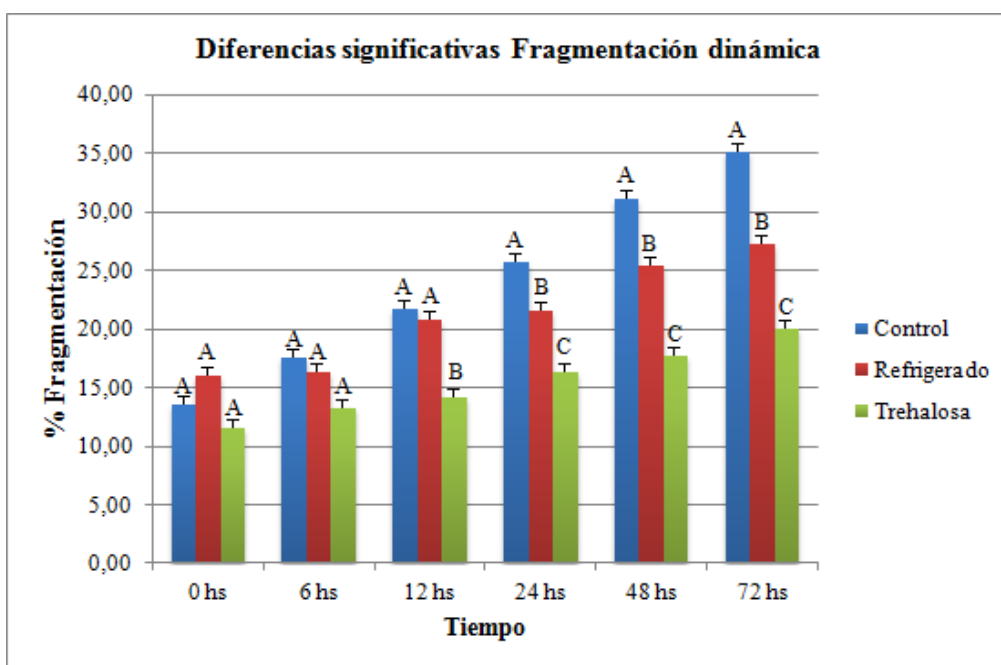


Gráfico N° 2: Diferencias significativas entre tratamientos y tiempos.

En el gráfico de barras (Gráfico 2) pueden apreciarse que tanto a las 0 horas como a las 6, los tres tratamientos no difieren significativamente en sus valores ($C_0 = 13,57$; $R_0 = 15,94$; $T_0 = 11,57$), sin embargo a partir de las 12 horas comienzan a apreciarse las primeras diferencias, que se mantienen, incrementándose, a lo largo de las horas. A partir de las 24 horas, las diferencias se hacen significativamente diferentes entre los tres tratamientos. En el caso del tratamiento Control, las diferencias entre los diferentes momentos son marcadas, aunque se mantiene con valores similares a los obtenidos con el Refrigerado durante las primeras 12 horas ($C_{12} = 21,67$; $T_{12} = 20,76$).

Tanto los gráficos anteriormente mostrados como los valores resumidos en el cuadro, indican que al comienzo del ensayo los valores de fragmentación del ADN son similares, incrementándose de manera marcada entre las 6 y las 12 horas, manteniéndose en aumento constante, sin embargo, para el tratamiento con trehalosa se observan los valores más bajos de fragmentación a lo largo del todo el ensayo, con un mínimo de 7% para el tratamiento T0 y un máximo de 24,67% para el tratamiento T72, dichos valores son seguidos por los obtenidos con el Refrigerado.

5. DISCUSIÓN

La implementación de un sistema de IATF tiene un impacto positivo sobre la rentabilidad de una empresa de producción animal, dado que se trata de una tecnología relativamente económica, pudiéndose reducir su costo a través del empleo del semen refrigerado en lugar del semen congelado, el cual requiere un aditamento especial, el tanque de nitrógeno líquido para la preservación del material, sin embargo la principal dificultad a superar en el empleo de la técnica es reducir la pérdida de material genético por la muerte celular.

Vishwanath y Shannon (2000) señalan que el principal problema en el almacenamiento de semen en estado refrigerado es su corta vida útil, en este estudio se buscó evaluar si la incorporación de la trehalosa, un crioprotector no permeante, permite conservar de manera efectiva el ADN de las células espermáticas y esta manera prolongar su viabilidad.

Diversos estudios, como es el caso de los realizados por el Dr. Hu, como así también los publicados por el Dr. López-Sáez, han analizado la acción de la trehalosa sobre las células espermáticas de diferentes especies domésticas, obteniéndose, mayoritariamente, resultados positivos, como por ejemplo, los resultados obtenidos en el trabajo de investigación del Dr. Hu y su equipo de investigadores, plasmados en el cuadro 4, el mismo se expone a continuación:

Grupo	Control	Trehalosa 25 mM	Trehalosa 50 mM	Trehalosa 100 mM	Trehalosa 200 mM
Motilidad espermática	36,88 ± 1,53	38,34 ± 1,35	44,36 ± 1,83	46,61 ± 1,62	35,30 ± 1,37
Integridad acrosomática	53,4 ± 1,85	55,26 ± 1,32	59,47 ± 1,03	64,78 ± 1,35	51,33 ± 1,17
Integridad de membrana	36,22 ± 2,11	36,67 ± 1,95	38,73 ± 1,74	44,33 ± 1,71	34,43 ± 2,14

Cuadro N° 4: Efecto de distintas concentraciones de trehalosa sobre motilidad post descongelado, integridad de la membrana acrosomal e integridad de la membrana plasmática en espermatozoides bovinos descongelados. Fuente: Cuadro tomado de la investigación “Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen” (Hu y col., 2010).

Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de los mencionados ensayos se han hecho sobre semen congelado y / o refrigerado de diversas especies domésticas pero no con tanto hincapié en la especie bovina, como sucedió en el presente trabajo. También es importante señalar que, hasta la fecha, el uso de éste azúcar para la conservación del semen bovino no es tan habitual, como si lo es en el caso del semen ovino, tanto congelado (Hu y col., 2009) como refrigerado (López-Sáez y col, 2000). Para el semen bovino habitualmente se emplea la sacarosa.

Los resultados obtenidos en el presente ensayo indican que, por un lado, respecto del Control, el tratamiento de Refrigerado tiene un efecto positivo respecto de la reducción de fragmentación del ADN de los espermatozoides bovinos, mientras que por otro lado, la adición de trehalosa (150 mOsm) tiene un efecto significativamente mayor, favoreciendo la preservación del material genético, actuando como un buen criopreservante de las membranas celulares. Es importante señalar que efectos similares fueron analizados, especialmente en lo que respecta a la viabilidad de las células, por otros equipos de investigación,

como es el caso del estudio realizado por el Dr. Hu y sus colaboradores (2010), donde se indica que altas concentraciones de trehalosa, superiores a los 200 mOsm, tienen un efecto tóxico sobre la viabilidad del semen bovino criopreservado, contrastado sobre las concentraciones de control (0 mOsm) y 100 mOsm. Sin embargo no realizó la evaluación con una concentración de 150 mOsm ni tampoco en lo que respecta a la evaluación de la fragmentación del ADN, sino que se hizo énfasis en la integridad de las membranas.

Al analizar los demás tratamientos, se observa que en los primeros tiempos de evaluación, hasta las 12 horas, se obtienen valores similares de fragmentación dinámica. Superado ese periodo de tiempo, los valores comienzan una marcada diferenciación, aumentando drásticamente en el caso del tratamiento Control. En el caso del tratamiento Refrigerado (5-7°C) se observan valores intermedios de fragmentación, asociándose este fenómeno al efecto que tienen las bajas temperaturas sobre la actividad metabólica de las células, en este caso, los espermatozoides, reduciendo la misma. En el caso del tratamiento Control, al encontrarse el material expuesto a la temperatura ambiente por tiempo prolongado (72 horas), fueron susceptibles a tres posibles escenarios: stress oxidativo, stress por efecto del plasma seminal y la producción de radicales libres endógenos (Vishwanath y Shannon, 2000). Esos tres factores afectan severamente las membranas celulares, ocasionando efectos adversos sobre la estabilidad del ADN contenido en el núcleo celular, favoreciendo así el aumento de la Fragmentación.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se expone que es viable la incorporación de la trehalosa como criopreservante para la técnica de IATF, por su efecto positivo en la prevención de la fragmentación del ADN del núcleo de los espermatozoides bovinos, especialmente si la misma va a realizarse empleando semen refrigerado, dado que permite prolongar el tiempo de uso del mismo, logrando una mejor organización de las tareas a la hora de aplicar la técnica sobre un rodeo de vacas, es decir, se logra una mayor flexibilización de los tiempos a la hora de inseminar. Si bien la fragmentación del ADN tiende a aumentar a lo largo del tiempo, mientras los valores se mantengan por debajo del 30 %, valor que surge de lo estudiado por la ciencia en reproducción humana (Vélez de la Calle y col., 2008) es prudente emplear el material para inseminar. En humanos este valor es de suma importancia, marcándose un umbral para el uso de las muestras de hasta 24 horas. Sin embargo, en bovinos dicho umbral no ha sido estimado aún, dado que, tomando como referencia las 24 horas del semen humano (Considerando una fragmentación de hasta el 30%) (Mehdi y Khantouche, 2009), en el caso del semen bovino se estima que el 50% de los espermatozoides ($14,25 \times 10^6$ espermatozoides/ ml), o más, están vivos con el 70% de motilidad, lo cual indica que aún hay material para inseminar, la pregunta obligada es: ¿Hasta qué momento es prudente inseminar? A través de los resultados obtenidos en el presente ensayo, es posible afirmar que, para la especie bovina, el material para inseminar se encuentra en muy buenas condiciones fértiles durante las primeras 12 horas de obtenida la muestra, en el caso de no aplicar ninguna técnica de preservación, y hasta 24 horas si el material es sometido a la refrigeración o empleado trehalosa al momento de su dilución.

6. CONCLUSIONES

- La trehalosa tiene un efecto positivo en la prevención de altos índices de Fragmentación dinámica en el ADN de los espermatozoides bovinos, manteniendo a la misma por debajo del 15%, en promedio, lo cual indica que su uso como criopreservante es eficaz y utilizable como herramienta para las tareas de IATF.
- Es posible que las bajas temperaturas (5-7°C) produzcan una disminución en el metabolismo celular de los espermatozoides esto podría reducir los efectos negativos de los radicales libres endógenos y el stress oxidativo sobre las membranas celulares, y permitiría una mejor conservación del material genético, expresándose por una menor fragmentación.
- Sería útil evaluar cómo es la variación en los niveles de fragmentación dinámica frente a distintas concentraciones de trehalosa, buscando así si pueden obtenerse valores similares, especialmente, a menores concentraciones.

Además, se considera de importancia establecer un umbral, medido tanto en horas como en porcentaje de fragmentación, para uso óptimo del material genético en la técnica de IATF en bovinos. En base a lo observado, es posible afirmar que el umbral para los bovinos se encuentra alrededor del 35%, considerando que, finalizadas las primeras 24 horas de obtenida la muestra, se cuenta con un 50% de espermatozoides vivos de los cuales sólo el 35% tendría su ADN dañado, lo se traduce en, aproximadamente, 10 millones de espermatozoides sanos. De todas formas, en función de lo observado en los gráficos, no es prudente esperar tanto tiempo para realizar la inseminación. El rango óptimo está entre las 0 y 12 horas desde obtenido el material.

7. ANEXOS

7. 1 Anexo: Protocolo de la técnica de TUNEL

1) Portaobjeto con 21 wells se deja previamente en 30 μ l de Poly-lisina/well al menos 2 horas previas a la siembra de muestras (pueden almacenarse durante una semana a una temperatura de 4°C)

2) -En muestras de semen humano: las muestras fijadas se centrifugan por 5 minutos a 2500 rpm para concentrar. Se retiran 400 μ l del sobrenadante, aproximadamente, y se re suspenden en el volumen restante (este paso depende de la concentración de cada muestra).

-En muestras de semen bovino: se realiza un recuento de la concentración en el material fijado, con valores de aproximadamente 28.5×10^6 spa/ml no se realiza la centrifugación para concentrar. Las muestras deben ser re suspendidas con cuidado, con una pipeta de 1000 μ l.

3) Previo a la siembra de muestras, absorber el exceso de Poly-lisina con papel Tissue (Cortar el papel en tiras de 4 cm x 10 cm y luego doblar por la mitad del ancho, para retirar el material se debe comenzar por el extremo del papel que posea el dobles y no las puntas sueltas). Lavar 3 veces con 20 μ l de agua destilada/well durante 2 minutos. Dejar secar a temperatura ambiente (no en platina). Luego rotular con fecha y número de nuestra (es recomendable utilizar un portaminas n° 0.5 para evitar que el polvillo del grafito se desplace por el portaobjetos).

4) Sembrar 30 μ l de muestra. Dejar a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 1 hora, como mínimo. Realizar en la siembra un Control Negativo, sembrando una de las muestras de manera repetida, en general se repite la última muestra sembrada.

5) Absorber las muestras. Lavar 3 veces con 15 μ l de PBS durante 3 minutos. Absorber el volumen con papel Tissue cuidando de no tocar el fondo del well.

6) Permeabilizar con 5 μ l de Metanol FRIO/well (-20°C) durante 2 minutos. El tiempo empieza a correr con el primer well. NO SACAR.

7) Agregar 15 μ l de PBS para lavar y absorber enseguida con papel Tissue.

8) Bloquear con 15 μ l de solución bloqueo/well (BSA al 4% de PBS o leche “Svelty” en polvo al 5%). Durante 20-30 minutos a temperatura ambiente.

9) Absorber la solución de bloqueo. Agregar 10 μ l por well del anticuerpo primario (Asp-175 (5A1E) Cell Signaling Rabbit mAB #9664) con una dilución de 1:100 en BSA al 1%. Control Negativo: Agregar 10 μ l de BSA 1% e incubar a 4°C en cámara húmeda “overnight” (Este paso no se realiza para semen bovino, a excepción de la absorción de la solución de bloqueo).

10) Al día siguiente, absorber y lavar 4 veces con 15 μ l de PBS, por 3 minutos. Absorber el exceso (NO se realiza en semen bovino, se continua la técnica el mismo día).

11) Se preparan 5 μ l de Solución TUNEL y Anticuerpo secundario (para bovinos sólo TUNEL) por well. Incubar durante 1 hora a 37°C. Se debe prepara la solución para una muestra más, el control negativo, se cuenta entonces: n° muestras +1.

- Kit Roche: Dilución de la enzima (1:10) en “label”. Dilución del anticuerpo secundario (1:200) en solución de TUNEL (no se realiza en bovinos).
- Kit Calbiochem: Dilución de la enzima (1:20) en “label”. Dilución del anticuerpo secundario (1:200) en solución de TUNEL (no se realiza en bovinos).

12) Lavar con 15 μ l de PBS, 6 veces por 2 minutos; absorber el exceso.

13) Dejarlo secar en platina. Montarlo con Vectashield H-1000 (medio para retardar la fluorescencia) (se debe trabajar con cuidado porque es un aceite muy viscoso) agregando una gotita por well (aproximadamente 2 μ l), cubrir con un “coverslip” y sellar con esmalte para uñas (comenzando por el ancho donde está la escritura y luego siguiendo por los largos)

14) Conservar en freezer.

7. 2 Anexo: Plantilla para el relevamiento de datos del conteo

Tratamiento	Tiempo (hs)	Porcentaje (%) TUNEL positivo				Promedio
Control	0					
	6					
	12					
	24					
	48					
	72					
Refrigerado	0					
	6					
	12					
	24					
	48					
	72					
Trehalosa	0					
	6					
	12					
	24					
	48					
	72					

7. 3 Anexo: Imágenes del instrumental empleado

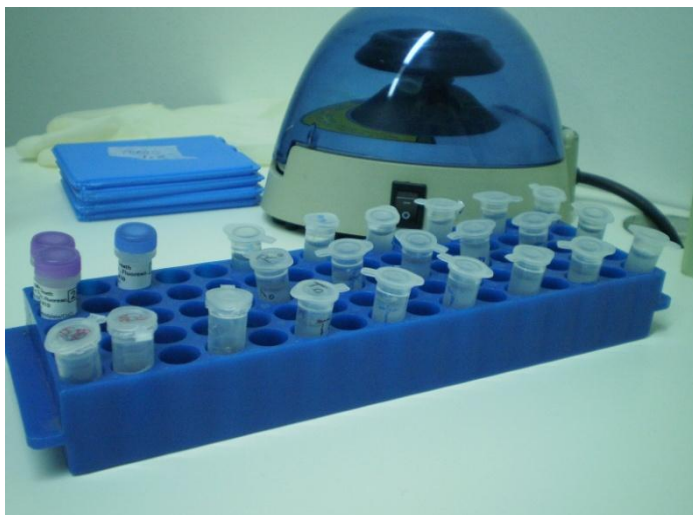


Imagen N°7: Muestras en sus respectivos tubos de Eppendorf

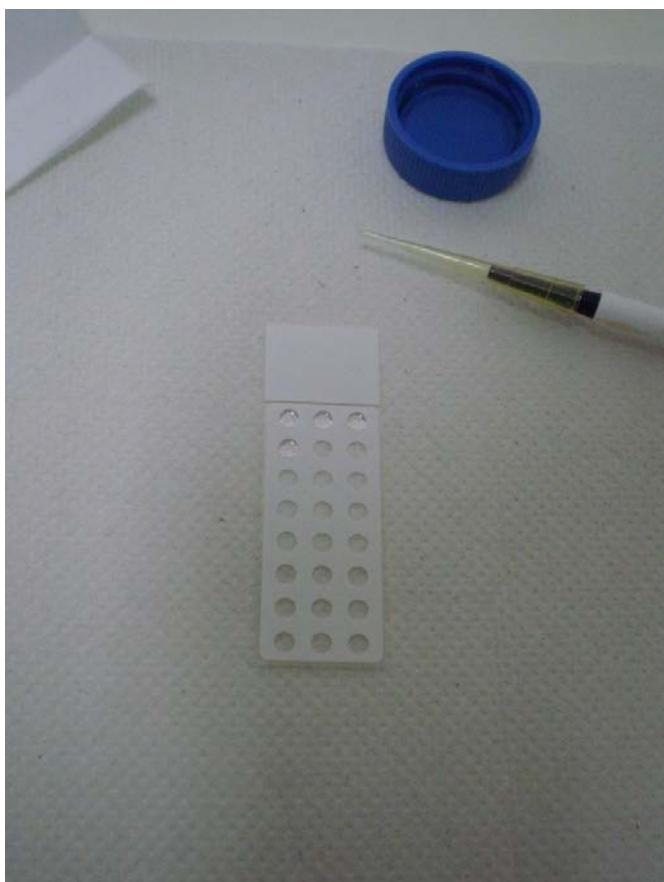


Imagen N°8: Portaobjetos con 21 wells



Imagen N°9: Solución PBS empleada para los lavados



Imagen N°10: Muestra en cámara húmeda



Imagen N°11: Aplicación de Vectashield® H-100



Imagen N° 12: Portaobjetos con muestras montadas listas para su conservación en freezer (-20°C)

7. 4 Anexo: Imágenes de las muestras bajo la técnica de TUNEL (40x)

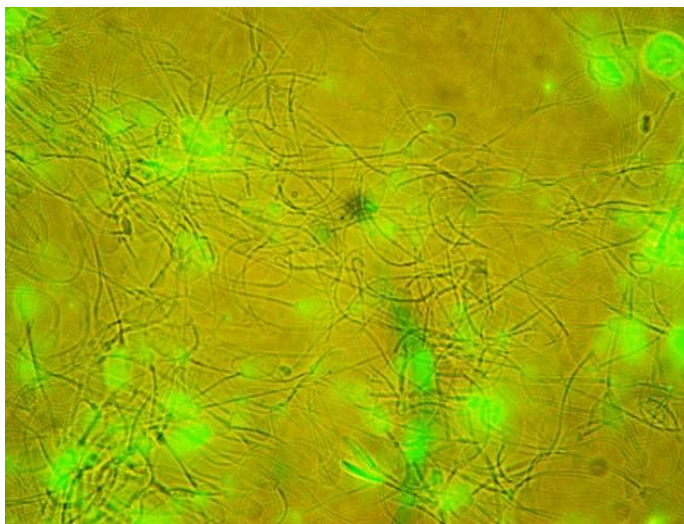


Imagen N°13: Tratamiento Control (72 hs)

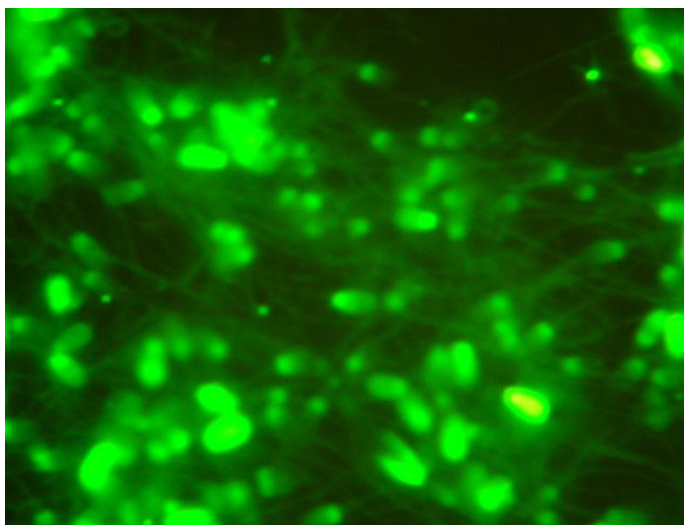


Imagen N°14: Tratamiento Control (72 hs) (Flujo de luz interrumpido)

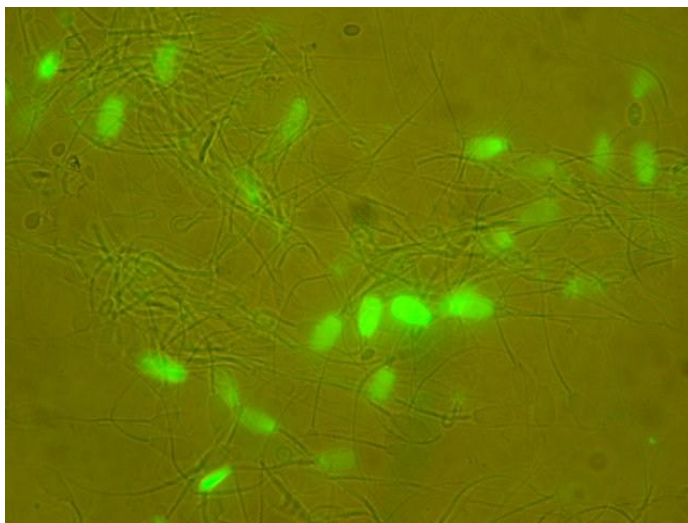


Imagen N°15: Tratamiento Refrigerado (72 hs)

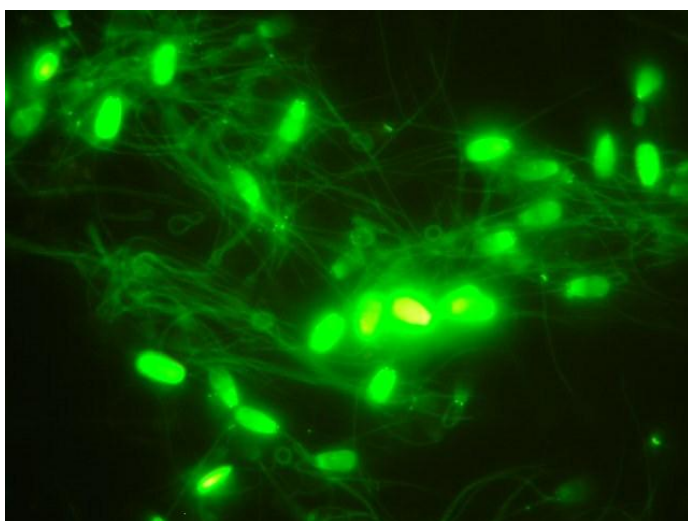


Imagen N°16: Tratamiento Refrigerado (72hs) (Flujo de luz interrumpido)

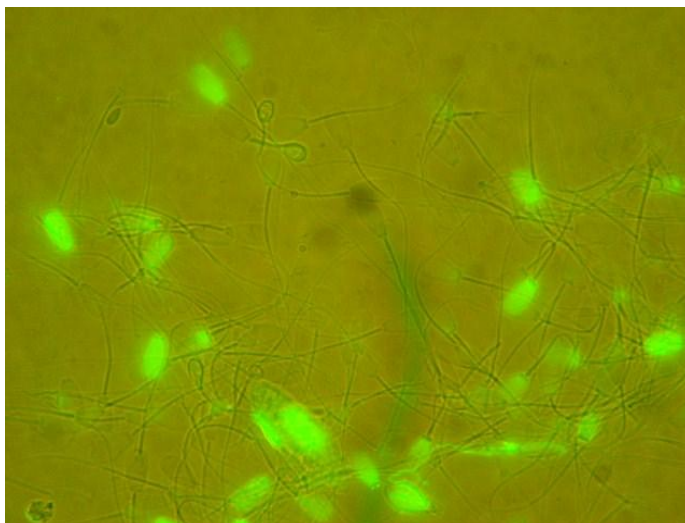


Imagen N°17: Tratamiento Trehalosa (72 hs)

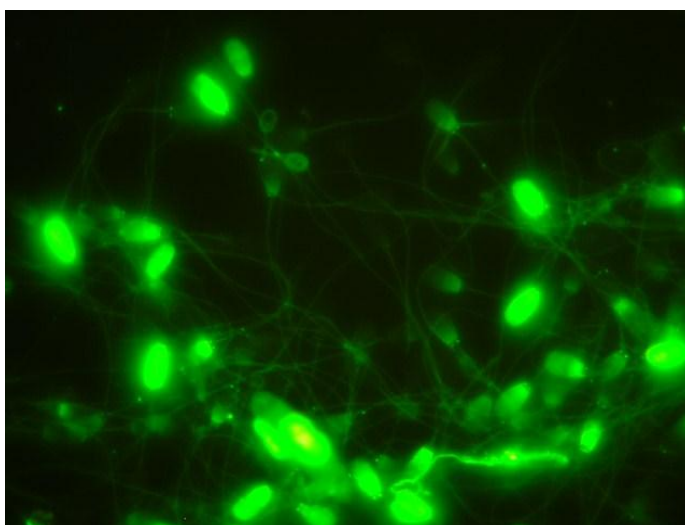


Imagen N°18: Tratamiento Trehalosa (72 hs) (Flujo de luz interrumpido)

7.5 Anexo: Abstract del trabajo

CHARACTERIZATION OF DNA FRAGMENTATION DYNAMICS IN THE REFRIGERATION OF BOVINE SPERMATOZOA

N. Salinas^a, M. Faut^b, A. Perez^a, E. Martínez^a, S. Márquez^a, J. Galotta^a, V. Rawe^b,
G. Taminelli^a and M. Sansinena^{a,b,c}



^aLaboratorio de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina, Buenos Aires, Argentina and ^bLaboratorio de Patología de Gametas, Reprotec, Buenos Aires, Argentina, ^cConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

INTRODUCTION

...Refrigeration of bovine sperm provides a window of opportunity for storage/transportation of semen and provides a management option in combination with fixed-time artificial insemination.

...Because sperm cells cooled above the freezing point of water have been reported to sustain irreversible injury due to lipid phase transition of the cell membrane, the most widely reported effect of cooling is a marked reduction in motility. In addition, sperm subjected to cryopreservation or stored under cooling conditions may experience damages to cell membrane, including an increase in oxidative stress due to production of free radical oxygen species and induction of apoptotic pathways.

...Recently, sperm DNA fragmentation has gained attention as an indicator of fertilizing ability and pregnancy outcomes in humans and several authors have analyzed the effect of threshold values of sperm DNA fragmentation as a predictive tool of fertility and pregnancy outcomes. A 20-30% threshold has been reported, values above correlating with couples were 7 times less likely to conceive.

...Uridine nick-end labeling assay (TUNEL) assay adds labeled nucleotides to free nuclear DNA ends (broken DNA strand) with the use of a terminal deoxynucleotidyl transferase. The quantity of DNA 3'-OH free ends can be assessed in spermatozoa, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme incorporates a fluorescent UTP at the 3'-OH end, rendering fluorescence proportional to the number of DNA strand breaks. The fluorescence intensity of each sperm cell is interpreted as a "yes" or "no" answer on a fluorescent light microscope.



...There are no reports of the dynamics of DNA damage during cold storage for the bovine species.

OBJECTIVE

...The objective of this study was to describe the dynamic DNA fragmentation patterns for ambient temperature and refrigerated bovine sperm during a 72 h storage period and to compare sperm DNA fragmentation index (sDFI) findings with microscopic parameters normally evaluated by practitioners in the field.

MATERIALS AND METHODS

...Ejaculates from five, Black Angus bulls were collected by electroejaculation, diluted in tris-buffered extender containing egg yolk (20% v/v) and glycerol (7% v/v), adjusted to pH of 6.8 and maintained at 32° C. They were then adjusted to equal number of spermatozoa (500x10⁶ sperm/ml), pooled into a heterospermic sample which was then divided into two groups: (i) ambient temperature (20-22° C), (ii) refrigerated (0.67° C/min) to a final maintenance and storage temperature of 5-7° C and analysed at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h post-collection.

...Individual progressive motility (IPM) and membrane integrity (eosin, 1-step protocol, WHO) were blindly assessed by experienced technician.

...Uridine nick-end labeling (TUNEL) assay was used to study the extent of DNA damage, sperm DNA fragmentation index (sDFI, expressed as ratio of sperm with fragmented DNA vs. total spermatozoa, 200 total spermatozoa/slide) was obtained using a commercially available kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and fluorescence microscopy (Nikon Eclipse T-200, 40X).

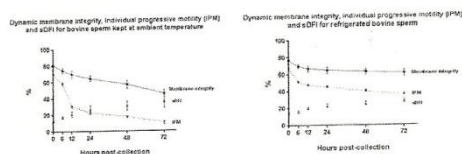
...Results were analyzed using analysis of variance in a measured repeated design with six replicates, post hoc pairwise comparisons between treatments for each time period were conducted using Tukey's test, p was considered significant at the 0.05 level.

RESULTS

...There were no significant differences ($p>0.05$) in individual progressive motility, membrane integrity and sDFI between ambient temperature and refrigerated groups at 0 and 6 h post-collection.

...Individual progressive motility differed significantly ($p<0.05$) at 12 (47 v. 30%), 24 (45 vs. 23%) 48 (40 vs. 18%) and 72 (35 vs. 10%) h post-collection. Membrane integrity differed significantly at 48 h (63 vs. 57%) and 72 h (61 vs. 45%) post collection.

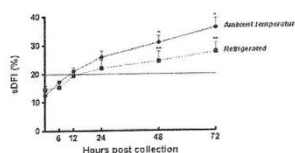
...sDFI differed significantly at 48 h (25 vs. 31%) and 72 h (28 vs. 26%) post collection.



...In agreement with previous reports, our study indicated that refrigeration of diluted semen allows for storage and maintenance of acceptable microscopic viability characteristics (progressive motility and viability) for a period of up to 48 h post-collection.

...In our study, reproductively fertile bulls exhibited an average rate of 12% sperm DNA damage at the time of collection and this rate increased with storage time.

Comparison of dynamic sDFI for ambient temperature and refrigerated bovine sperm



DISCUSSION AND CONCLUSIONS

...In humans, several authors have analyzed the effect of threshold values of sperm DNA fragmentation as a predictive tool of fertility and pregnancy outcomes following assisted fertilization. In 2002, Evenson et al. reported for humans that when sperm DNA damaged exceeded 20%, couples were 7 times less likely to conceive.

...Results of this study indicate a disparity between the microscopic characteristics commonly assessed by practitioners in the field and the patterns of dynamic DNA fragmentation of refrigerated bovine semen.

...Further studies should analyze DNA fragmentation thresholds and to study their impact on conceptions and pregnancy rates in the bovine species.

Análisis de la varianza

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

Tratamiento	Tiempo	Medias	n	E.E.
Control	0	1.00	10	0.10
Control	1	1.00	10	0.10
Control	2	1.00	10	0.10
Control	3	1.00	10	0.10
Control	4	1.00	10	0.10
Control	5	1.00	10	0.10
Control	6	1.00	10	0.10
Control	7	1.00	10	0.10
Control	8	1.00	10	0.10
Control	9	1.00	10	0.10
Control	10	1.00	10	0.10
Control	11	1.00	10	0.10
Control	12	1.00	10	0.10
Control	13	1.00	10	0.10
Control	14	1.00	10	0.10
Control	15	1.00	10	0.10
Control	16	1.00	10	0.10
Control	17	1.00	10	0.10
Control	18	1.00	10	0.10
Control	19	1.00	10	0.10
Control	20	1.00	10	0.10
Control	21	1.00	10	0.10
Control	22	1.00	10	0.10
Control	23	1.00	10	0.10
Control	24	1.00	10	0.10
Control	25	1.00	10	0.10
Control	26	1.00	10	0.10
Control	27	1.00	10	0.10
Control	28	1.00	10	0.10
Control	29	1.00	10	0.10
Control	30	1.00	10	0.10
Control	31	1.00	10	0.10
Control	32	1.00	10	0.10
Control	33	1.00	10	0.10
Control	34	1.00	10	0.10
Control	35	1.00	10	0.10
Control	36	1.00	10	0.10
Control	37	1.00	10	0.10
Control	38	1.00	10	0.10
Control	39	1.00	10	0.10
Control	40	1.00	10	0.10
Control	41	1.00	10	0.10
Control	42	1.00	10	0.10
Control	43	1.00	10	0.10
Control	44	1.00	10	0.10
Control	45	1.00	10	0.10
Control	46	1.00	10	0.10
Control	47	1.00	10	0.10
Control	48	1.00	10	0.10
Control	49	1.00	10	0.10
Control	50	1.00	10	0.10
Control	51	1.00	10	0.10
Control	52	1.00	10	0.10
Control	53	1.00	10	0.10
Control	54	1.00	10	0.10
Control	55	1.00	10	0.10
Control	56	1.00	10	0.10
Control	57	1.00	10	0.10
Control	58	1.00	10	0.10
Control	59	1.00	10	0.10
Control	60	1.00	10	0.10
Control	61	1.00	10	0.10
Control	62	1.00	10	0.10
Control	63	1.00	10	0.10
Control	64	1.00	10	0.10
Control	65	1.00	10	0.10
Control	66	1.00	10	0.10
Control	67	1.00	10	0.10
Control	68	1.00	10	0.10
Control	69	1.00	10	0.10
Control	70	1.00	10	0.10
Control	71	1.00	10	0.10
Control	72	1.00	10	0.10
Control	73	1.00	10	0.10
Control	74	1.00	10	0.10
Control	75	1.00	10	0.10
Control	76	1.00	10	0.10
Control	77	1.00	10	0.10
Control	78	1.00	10	0.10
Control	79	1.00	10	0.10
Control	80	1.00	10	0.10

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

8. AGRADECIMIENTOS

A mi profesora y tutora Marina Sansiñena, por su ayuda brindada a lo largo de todo el trabajo, especialmente por sus enseñanzas impartidas sobre el mundo de la investigación científica.

Al profesor Eduardo Martinez y Alejandro Rossi por permitir unirme a sus viajes a campo y por ayudarme a conseguir el material sin el cual no hubiera sido posible este trabajo.

A la Dra. Vanesa Rawe por abrirme las puertas de su prestigioso laboratorio y poder realizar mis ensayos en el mismo.

A la Lic. Mónica Faut por su paciencia y dedicación para enseñarme todo lo necesario sobre la técnica de TUNEL, como así también por las divertidas charlas para pasar los ratos de espera entre paso y paso.

A la Lic. Adriana Pérez por su dedicación y paciencia para responder todas mis dudas sobre el diseño estadístico, especialmente por entregar parte de su tiempo de ocio en dicha tarea.

A mi familia y mis amigos por brindarme su apoyo incondicional y darme ánimos para poder concluir éste trabajo.

Finalmente, a mi madre, quien me ha brindado la posibilidad de estudiar en una institución como la Universidad Católica Argentina y por tener una fe implacable sobre mis capacidades.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aisen E., Quintana M., Medina V., Morello H., Venturino A. **Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders.** *Cryobiology* 2005 50:239–249.
- Aiteken R.J., Gordon E., Harkiss D. **Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human.** *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-46
- Aranda J.S, Hernández-Oropeza J.I, **La Biosíntesis de Trehalosa en *Saccharomyces cerevisiae*: Aspectos Generales y Modelación Metabólica.** *BioTecnología*, Año 2011, Vol. 15 No. 3
- Ávila-Portillo L.M., Madero J.I, López C., León M.F., Acosta L., Gómez C., Delgado L.G, Gómez C., Lozano J.M., Reguero M. T. **Fundamentos de criopreservación.** *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 2006; 57 (4): 291-300
- Angelino Olivera, J.N. **Manual de evaluación de semen en bovinos.** Trabajo práctico educativo para la obtención de título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, México. 2009.
- Avonce N., Leyman B., Mascorro-Gallardo J.O., Van Dijck P., Thevelein J. M., Iturriaga G. **The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling.** *Plant Physiol* 136. 2004; 3649-3659.
- Balhorn R. **A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.** *J Cell Biol* 93,298–305. 1982
- Bo G.A., Cutaia L.E., Souza A.H., Baruselli E.S., **Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona.** *Revista Taurus.* Buenos Aires. 2009.
- Boiso I. **Principios básicos de criobiología.** *Revista Iberoamericana de fertilidad* 2007 vol. 18 n°4
- Brumfiel G. **Just add water.** *Nature* 428. 2004; 14-15
- Bucak M. N., Ateşşahin A., Varışlı Ö., Yüce A., Tekin N., Akçay A. **The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process.** *Theriogenology* 67 2007;1060–1067.
- Burrello N., Arcidiacono G., Vicari E., Asero P., di Benedetto D., de Palma A., et al. **Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate.** *Hum Reprod.* 2004; 19:2298-302.
- Cabib E., Leloir L. **The biosynthesis of trehalose-phosphate.** *J Biol. Chem.* 231. 1958; 259-275
- Carver D. A., Ball B. A.. **Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C.** *Theriogenology.* Volume 58, Issue 8, 2002, 1587–1595.

- Colaco C., Sen S., Thangavelu M., Pinder S., Roser B. **Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology.** Bio/Technol. 10. 1992; 1007-1111.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Chapman D. **Preservation of membranes in anhydrabiatic organism: the role of trehalosa.** *Science* 1984; 223: 209-217
- Crowe J.H., Crowe L.M., Oliver A.E., Tsvetkova N., Wolkers W., Tablin F. **The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state.** *Cryobiology* 43. 2001; 89-105.
- Cunningham J.. **Fisiología Veterinaria.** 4ta Edición. Editorial Elsevier. 2009. Sección I, Capítulo 2. 45-48.
- Curtis H., Barnes N. S., **Biología.** 6ta edición. Editorial Panamericana. 2004. Sección 7, Capítulo 50, 1316:1318.
- Elbein A., Pan Y., Pastuszak I., Carroll D. **New insights on trehalose: a multifuncional molecule.** *Glycobiology* 13; 2003; 17R-27R.
- El Cortés-Gutiérrez, Crespo F., Serres-Dalmau C., Gutiérrez de las Rozas A. L., Dávila- Rodríguez M. I., López-Fernández C., Gósalvez J. **Assesment of Sperm DNA fragmentation in Stallion (*Equus caballus*) and Donkey (*Equus asinus*) using the Sperm Chromatin Dispersion Test.** *Reprod Dom Anima* 2008
- Eroglu A., Russo M.J., Biegansky R., Fowler A., Cheley S., Bayley H., Toner M.. **Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells.** *Nature Biotechnol.* 18. 200; 163-167.
- Fatehi A.N., Bevers M.M., Schoevers E., Roelen B.A., Colenbrander B., Gadella B.M. **DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleaveges.** *J Androl* 2006; 27: 176-88
- Fernández E. **Cambios celulares en el tiempo.** Configuración de los seres vivos. 2009. Departamento de Histología. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad Miguel Hernández. España.
- Fernández J., Vélez de la Calle J., Tamayo M., Cajigal D., Agarwal A., Gosálvez J. **Sperm DNA integrity and male infertility: current perspectives.** *Arch Med Sci* 2008; 4, 4B
- Garg A., Kim J.K., Owens T. G., Ranwala A. P., Choi Y. D., Kochian L. V., Wu R. J. **Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses.** *PNAS* 99, 2002; 15898-15903
- Gómez M.V.; Migliorisi A.L. **Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes.** Cátedra Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.
- Gorczyca W., Gong J., Darzynkiewicz Z. **Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminaldeoxynucleotidyl transferase and nick translation assays.** *Cancer Res.* 1993; 53:945-51.
- Guo N., Puhlev I., Brown D. R., Mansbrigde J., Levine F. **Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells.** *Nature Biotechnol.* 18. 200; 168-171.
- Higashiyama T. **Novel functions and applications of trehalose.** *Pure Appl. Chem* 74. 2002; 1263-1269.

- Hu J. H., Li Q. W., Li G., Jiang Z. L., Bush., Yang H., Wang L. Q. **The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality**. Anim. Reprod. Sci. 112 2009;107-118.
- Hu, J.H.; Zan, L.S.; Zhao, X.L.; Li, Q.W.; Jiang, Z.L.; Li, Y.K.; Li, X. **Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bobine semen**. Journal of animal Science 2010.
- Iwaya-Inoue M., Takata M. **Trehalose plus chloramphenicol prolong the vase life of tulip flowers**. HortScience 36. 2001; 946-950
- Katsuno M., Adachi H., Sobue G. **Sweet relief for Huntington disease**. Nature Medicine 10. 2004; 123-124
- Kidd G., Devorak J. **Trehalose is a sweet target for agbiotech**. Bio/Technology 12. 1994; 1328-1329.
- Lins R.D., Pereira C.S., Hunenbergen P.H. **Trehalose protein in aqueous solution**. Proteins 2004; 55: 177-186.
- Loken S.D., Demetrik D.J. **A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens**. Hum Pathol 2005; 36: 977-80
- López-Sáez, A.; Ortiz, N.; Gallego, L.; Garde, J.J. **Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents**. Dpto. Ciencia y Teconología Agroforestal, ETSIA, Universidad de Castilla. La Mancha, Campus Universitario, Albacete, España. Archives of Andrology 44:155-164(2000).
- Marcon L., Boissonneault G. **Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling**. Biol Reprod 2004; 70: 910-8
- Marsden M. P. y Laemmli U. K... **Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model**. Cell 17, 849-58. 1979.
- Mascorro J.O., Avonce N., Iturriaga G. **Biología de la trehalosa en las plantas**. Revista Chapingo. Serie horticultura, julio-diciembre 2005, vol 11, número 002, pp 193-202. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Mathews K.M, van Holde K. E, Ahern K.G **Biochemistry**. Third edition. Addison Wesley; 2003 p. 363-92
- McGhee J. D. y Felsenfeld G. **Nucleosome structure**. Annual Review of Biochemistry 49, 1115-56. 1980
- McPherson S.M.G., Longo F.J. **Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids**. Eur J Histochem. 1993; 37:109-28.
- Mehdi, M., Khantouche L. **Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters**. (2009). Andrologia 41(6): 383-386.
- Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R., Zhao M. **Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis**. Chromosoma 111, 483-488. 2003
- Mendoza J.A., Dublin P., Warren T. **The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature**. Cryobiology 2000; 41: 319-23
- Ollero M., Gil-Guzmán E., López M.C., Sharma R.K., Agarwal A., Larson K., et al. **Characterization of subsets of human spermatozoa at different**

stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. Hum Reprod.2001; 16:1912-21.

- Paiva C. L., Panek A. D. **Biotechnological applications of the disaccharide trehalose.** Biotechnol. Annu. Rev. 2 1996: 293-314
- Pandey S., Walker P., Sikorska M., **Separate Pools Of Endonuclease Activity Are Responsible ForInternucleosomal And High-Molecular-Mass Dna Fragmentation During Apoptosis,** Biochemistry And Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 72 (11-12): 625-629 Nov-Dec, 1994.
- Polge C., Smith A. U. and Parkes A.S. **Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature** Nature 164, 666-669
- Richards A., Krakowka S., Dexter L. B., Schmid H., Wolterbeek A. P. M., Waalkens-Berendsen D., Shigoyuki A., Kurimoto M. **Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies.** Food. Chem. Toxicol. 40. 2002; 871-898.
- Roser B., Colaco C. **A sweeter way to freshers food.** New Scientist 138. 1993; 25-28
- Sakkas D., Manicardi G.C., Bizzaro D. **Sperm nuclear DNA damage in the human.** Adv Exp Med Biol 518, 73–84. 2003
- Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi P.G., Bianchi U. **Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa.** Revi Reprod. 1999; 4:31-7.
- Shaman J.A., Ward W.S., **Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure.** The Sperm Cell. Cambridge University. 2006. 2: 31-34.
- Singer M.A., Linquist S. **Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose.** Tibtech 16; 1998; 460-468
- Sotolongo B., Ward W.S. **DNA loop domain organization: the three dimensionalgenomic code.** J Cell Biochem 35, 23–26. 2003
- Sotolongo B., Huang T.T.F, Isenberger E., Ward W.S. **An endogenous nuclease in hamster, mouse and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized of apoptosis.** J Androl 2005; 26:272-80
- Sutovsky P., van Leyen K., McCauley T., Day B.N., Sutovsky M.. **Degradation of the paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, ART and mtDNA inheritance.** Reprod Biomed Online 8, 24–33. 2004.
- Tang M., Waring A.J., Hang M. **Trehalose-protected lipid membranes for determing membrane protein structure and insertion.** Journal of Magnetic Resonance 2007; 184: 222-227
- Tateno H., Kimura Y., Yanagimachi R. **Sonication per se is not as deleterious to spermchromosomes as previously inferred.** Biol Reprod 63, 341–346. 2000
- Thomas A., Meyers S., Ball B. **Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation.** En: Theriogenology. 2006. Vol. 65, N° 8, p. 1531-1550.

- Tortolero I., Arata-Bellabarba G., Osuna J.A., Gómez R., Regadera J., **Estrés oxidativo y función espermática. Revisión.** Rev. Venez. Endocrinol. Metab. v.3 n.3 Mérida oct. 2005
- Tsusaki K., Nishimoto T., Nakada T., Kubota M., Chaen H., Sugimoto T., Kurimoto M. **Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp.** R48. Biochem. Biophys. Acta. 1290. 1996: 1-3.
- Twigg, J.P., Irvine, D.S., Aitken, R.J. **Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection.** Hum Reprod. 1998; 13:1864-71.
- Vélez de la Calle JP, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jiménez C, Wittemer C, et al. **Sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test in ART programmes: results of a large prospective multicentre study.** Fertil Steril. 2008.
- Vilfan I.D., Conwell C.C., Hud N.V. **Formation of native-like mammalian sperm cellchromatin with folded bull protamine.** J Biol Chem 279, 20088–20095. 2004
- Walker P., Sikorska M., **Endonuclease Activities, Chromatin Structure, And Dna-Degradation In Apoptosis.** Biochemistry And Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 72 (11-12): 615-623 Nov-Dec 1994.
- Ward W.S. **Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa.** Biol Reprod 48, 1193–1201.1993
- Weisburd S. **Death-defying dehydration.** Science News 133. 1988; 107-110.
- Zalensky A.O., Siino J.S., Gineitis A.A., Zalenskaya I.A., Tomilin N.V., Yau P., Bradbury E.M. **Human testis/sperm-specific histone h2b (htsh2b). Molecular cloning and characterization.** J Biol Chem 277, 43474–43480. 2002