

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Evaluación de la compatibilidad de tinciones no fluorescentes de Diffquik, Giemsa, Fastblast y de Feulgen con el Bioensayo Cometa en el ADN espermático humano”**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Yat Sen Wong Alvaro

Lima, Perú

2016

## *DEDICATORIA*

Dedico esta tesis a la memoria de mi padre Alfredo Antonio por su fe depositada en mí, el gran ejemplo de valentía y esperanza que ha dejado como legado en el fondo de mi alma. A mi madre Brígida que con su dedicado amor y preocupación guían los pasos de mi vida. A mi hermana Meylyn por su comprensión y apoyo en cada momento.

## AGRADECIMIENTOS

El presente manuscrito es la suma de muchas variables que han modelado una realidad, una realidad que sin duda es el reflejo del apoyo de las personas que más quiero, admiro y respeto que con sus palabras de aliento me ayudaron a enfrentar este obstáculo tan alto que al principio confundí con el concepto tesis y a lo largo descubrí que la única complejidad radicaba en mí mismo, es por eso que expreso mi más sentido agradecimiento por ser ese combustible que impulsó llegar a mi meta y sobre todo en el camino, comprenderme.

En esta lista deseo agradecer primero al Mg. Mauricio Gonzales Molfino por su apoyo incondicional y sus enseñanzas tanto en el ámbito académico como el ámbito personal, por ser mi amigo y asesor en esta tesis y el anterior proyecto de tesis que por factores fuera de mi alcance no se pudo realizar. Gracias al Dr. Hugo Gonzales por sus agudas y certeras observaciones de este manuscrito y abrirme las puertas de su laboratorio.

A Elizabeth Dávila por su esmero y paciencia en cultivar en mí la semilla de la investigación.

A José Luis Llanos por ser leal amigo y brazo derecho en todas las actividades académicas que vengo realizando y participar activamente en cada parte de la experimentación y en la concepción de la idea del proyecto.

Un agradecimiento especial a mis amigos de Universidad Sandra León, Gianinna Cabanillas y Marysabel Salas por acompañarme en la gran aventura que es la formación de Pregrado, a Patricia Alcántara por ser el apoyo emocional a lo largo de todos estos años, a Karina Egg por ser mi alma gemela y estar en todos los momentos malos y buenos y sacar siempre lo mejor de mí.

A José Ávila por ser una de las gratas apariciones en mi vida y que con el tiempo descubrí que nos unía un lazo grande de hermandad y afinidad por la ciencia y otras cosas más.

A mi hermana, Meylyn Wong por soportar gentilmente mi carácter y mi frustración y finalmente agradecer profundamente a mis padres por ser el ejemplo a seguir en mi vida, mi papa Alfredo por confiar ciegamente en mí y demostrarme las ganas de luchar ante la mas difícil situación y mi mamá Brígida por la constante preocupación en el logro de mis sueños como si fueran suyos, actitudes que me han servido para caminar en esta ruta que es la vida, con paso firme.

# RESUMEN

La fertilidad masculina puede ser medida mediante un espermograma convencional, sin embargo este examen no incluye la valoración de la integridad del ADN espermático. Esta variable ha sido correlacionada con las tasas de fertilización, viabilidad y desarrollo del embrión, convirtiéndose en una herramienta de importancia clínica tanto para los programas de reproducción animal como los tratamientos de fertilidad asistida.

El bioensayo Cometa es capaz de determinar de una manera exacta el valor de la integridad del ADN espermático, lamentablemente este examen no es de uso rutinario por su elevado costo de implementación ya que utiliza microscopia especializada y tinciones fluorescentes para evidenciar la migración del ADN.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la compatibilidad de las tinciones no fluorescentes Diffquik, Giemsa, de Feulgen y FastBlast en el bioensayo Cometa usando un método visual y automatizado. Se utilizaron 15 eyaculados previamente seleccionados de acuerdo al manual OMS 2010, para luego ser capacitados en búsqueda de homogeneidad adecuada para la experimentación. Cada muestra fue expuesta a una gradiente de Peróxido de hidrogeno (0, 10, 30,60 y 100 mM) por 1 hora a 4°C para luego evaluar el coeficiente de daño mediante el método visual y porcentaje de ADN en la cola mediante el método automatizado.

Las pendientes de la regresión lineal en el método visual indican que los valores obtenidos por la tinción control SybrGreen ( $m=3,69$ ) difieren con Giemsa ( $m=3,45$ ) y Diffquik ( $m=2,57$ ). En el método automatizado de igual manera SybrGreen ( $m=0,83$ ), Giemsa ( $m=0,79$ ) y Diffquik ( $m=0,77$ ).

Sin embargo SybrGreen es 1,06 veces más efectivo que Giemsa en el visual y 1,05 veces en el automatizado, sugiriendo una compatibilidad con el bioensayo cometa. De igual manera SybrGreen es 1,07 veces más efectivo que Diffquik en el visual y 1,44 veces en el automatizado, concluyendo una compatibilidad solo en el método visual.

**Palabras clave:** Bioensayo Cometa, SybrGreen, Diffquik, Giemsa, Coeficiente de Daño, Porcentaje de ADN en la cola.

# ABSTRACT

Male fertility can be measured by a conventional semen analysis, however, this examination does not include the assessment of sperm DNA integrity. This variable has been correlated with fertilization rates, embryo viability and development, becoming a tool of clinical importance for both animal breeding programs and assisted fertility treatments.

Comet bioassay is able to determine an exact way the value of sperm DNA integrity, unfortunately this test is not routinely used because of its high cost of implementation because it uses specialized microscopy and fluorescent dyes to demonstrate DNA migration.

The objective of this research was to evaluate the compatibility of non-fluorescent dyes Diffquik, Giemsa, Feulgen and Comet FastBlast in the bioassay using a visual and automated method. 15 ejaculates were used previously manually selected according to WHO 2010 and then be trained in finding adequate homogeneity for experimentation. Each sample was exposed to a hydrogen peroxide gradient (0, 10, 30,60 and 100 mM) for 1 hour at 4 ° C and then assess the damage coefficient by visual method and percentage of DNA in the tail by automated method.

The slopes of the linear regressions on the visual method indicate that the values obtained by the SybrGreen Control staining ( $m = 3.69$ ) differ with Giemsa ( $m = 3.45$ ) and Diffquik ( $m = 2.57$ ). In the same way automated method SybrGreen ( $m = 0.83$ ), Giemsa ( $m = 0.79$ ) and Diffquik ( $m = 0.77$ ).

However SybrGreen is 1.06 times more effective than Giemsa visual and 1.05 times in the automated, suggesting a comet support bioassay. Similarly SybrGreen is 1.07 times more effective than Diffquik visual and 1.44 times in the automated, concluding compatibility only in the visual method.

Keywords: Bioassay Cometa, SybrGreen, Diffquik, Giemsa, damage coefficient, percentage of DNA in the tail.

# INDICE

INDICE .....	- 7 -
INDICE DE ANEXOS.....	- 8 -
I. INTRODUCCIÓN .....	- 9 -
II. MARCO TEORICO .....	- 11 -
Integridad del ADN espermático: Implicancias en la infertilidad.....	- 11 -
Estrés oxidativo .....	- 12 -
Detección de la fragmentación del ADN espermático.....	- 13 -
Tinciones sensibles al ADN .....	- 14 -
III. ANTECEDENTES.....	- 16 -
IV. METODOLOGIA .....	- 19 -
Lugar de ejecución .....	- 19 -
Tipo y diseño de investigación: .....	- 19 -
Operacionalización de las variables .....	- 20 -
Muestreo .....	- 20 -
Procedimiento:.....	- 20 -
Análisis de datos.....	- 22 -
Aspecto ético .....	- 23 -
V. RESULTADOS .....	- 24 -
VI. DISCUSIÓN .....	- 27 -
VII. CONCLUSIONES.....	- 30 -
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA .....	- 31 -
IX. ANEXOS.....	- 38 -

# INDICE DE ANEXOS

<b>Tabla N° 1.</b> Parámetros seminales evaluados de 35 sujetos, se resalta en amarillo los aceptados para la experimentación. _____	- 38 -
<b>Tabla N° 2</b> Resumen de los datos descriptivos de la población muestreada _____	- 39 -
<b>Tabla N° 3</b> Valores descriptivos de la población seleccionada pre y post capacitación _____	- 39 -
<b>Tabla N° 4</b> Valores descriptivos resumidos del coeficiente de daño detectado por cada tinción _____	40 -
<b>Tabla N° 5</b> Valores de la pendiente y ajuste de recta de la regresión lineal para el coeficiente de daño _____	- 40 -
<b>Tabla N° 6</b> Interacciones sobre el Coeficiente de daño detectado por el modelo lineal univariado _____	41 -
<b>Tabla N° 7</b> Valores descriptivos del porcentaje de ADN en la cola detectado por cada tinción _____	- 42 -
<b>Tabla N° 8</b> Valores de la pendiente y ajuste de recta de la regresión lineal para el porcentaje de ADN en la cola _____	- 42 -
<b>Tabla N° 9</b> Interacciones sobre el porcentaje de ADN en la cola por el modelo lineal univariado _____	43 -
<b>Figura 2</b> Figura en cajas de los estadísticos descriptivos del porcentaje de motilidad progresiva de las muestras pre capacitadas y post capacitadas _____	- 44 -
<b>Figura 3</b> Comparación de pendientes de las regresiones lineales de SybrGreen, Diffquik y Giemsa del coeficiente de daño y las concentraciones de Peróxido de Hidrogeno en el coeficiente de daño _____	- 45 -
<b>Figura 4</b> Figura de medias marginales de tinciones VS concentraciones de Peróxido de Hidrogeno _____	- 46 -
<b>Figura 5</b> Comparación de pendientes de las regresiones lineales de SybrGreen, Giemsa y Diffquik del coeficiente de daño y las concentraciones de Peróxido de Hidrogeno en el porcentaje de ADN en la cola _____	- 47 -
<b>Figura 6</b> Medias marginales de porcentaje de ADN en la cola de las tinciones SybrGreen, Giemsa y Diffquik en las diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrogeno _____	- 48 -
<b>Figura 1</b> _____	- 49 -

# I. INTRODUCCIÓN

La fertilidad masculina suele determinarse a través de un espermograma convencional que valora la concentración de espermatozoides por mililitro de eyaculado, el número de espermatozoides motiles, el número de espermatozoides vivos, el número de espermatozoides con una morfología normal, presencia y número de bacterias, leucocitos como células germinales inmaduras. Sin embargo se está comenzando a prestar especial atención sobre la integridad del genoma paterno ya que la contribución principal del espermatozoide no solo está limitada a llevar el ADN masculino al ovocito, entre otras funciones destacan regulaciones epigenéticas en la embriogénesis, fusión de gametos y control sobre el correcto clivaje embrionario en estadios tardíos manejado por el genoma espermático.

Circunstancialmente la calidad del eyaculado está afectado multifactorialmente tanto por variables intrínsecas como extrínsecas. En los factores intrínsecos destacan la edad y estilo de vida que están relacionados a un acortamiento en los telómeros, aumento de especies reactivas en oxígeno y fragmentaciones en las hebras de ADN y en los factores extrínsecos, la polución ambiental relacionada a disrupciones endocrinas. Estos factores citados impactan en diferente modo la calidad seminal pero presentan una misma consecuencia, la disminución de la fertilidad, se ha observado una tendencia de declive en esta última década que ha ido relacionada con un aumento del uso de tecnologías de reproducción asistida enfocadas en el factor masculino. La valoración de la calidad estructural del material genético se realiza mediante la cuantificación del grado de roturas o lesiones en las hebras de ADN, entendiéndose que a mayor número de lesiones, menor será la integridad del material genético y por lo tanto menor la probabilidad de que el que el espermatozoide sea plenamente funcional.

Altos índices de fragmentación de ADN están relacionados largamente con bajas tasas de fertilización por coito, como por técnicas de reproducción asistida, inclusive se ha hipotetizado que sea la causa de abortos prematuros en parejas. La prueba de fragmentación de ADN, es una técnica relativamente reciente y que complementa eficientemente estudio del factor masculino, porque es un marcador más exacto con las tasas de embarazo tanto bioquímico como clínico y permite una correcta elección del tipo de tratamiento que se implementará para mejorar la salud reproductiva del individuo, ahorrando significativamente el tiempo y costo.

Existen diferentes tipos de pruebas para cuantificar la fragmentación de ADN, desde pruebas analizadas por citometría de flujo (SCA), por adhesión de bases nitrogenadas marcadas especialmente (TUNEL), por cuantificación del ADN frente a una solución proteínicamente denaturante (SCD) o la cuantificación de la migración del ADN frente a un campo eléctrico

(Ensayo Cometa). El ensayo cometa es un método microscópico fluorescente rápido y muy sensible que permite detectar daños en el ADN producidos por un rompimiento simple o doble en la cadena, daño oxidativo inducido y entrecruzamiento de ADN-ADN/ADN-proteína, se basa en la fragilidad que poseen los sitios dañados, estos al ser sometidos a un pH superior a trece (13), su comportamiento y migración en una electroforesis cambia. Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la cola del “cometa”, entre más larga sea esta porción mayor será el daño ocasionado al ADN. Lamentablemente este método de diagnóstico es muy poco utilizado debido a su alto costo de implementación por lo avanzado de los instrumentos de medición. La visualización de la migración del ADN se realiza mediante un microscopio epifluorescente equipado con cubos dicróicos y una cámara tipo CCD para su documentación usando fluorocromos como SybrGreen, Bromuro de etidio, DAPI, Naranja de acridina, y otros. Todo esto representa una seria limitación para la adopción de este bioensayo como diagnóstico rutinario, llegando a ser exclusivo de laboratorios de alta tecnología, debido al costo elevado de los materiales que se utilizan, consecuentemente excluyendo a muchos pacientes de este útil diagnóstico.

Sin embargo existen otras tinciones capaces de detectar el ADN y que presentan la característica de poder ser observables a 520 nm, es decir la longitud de onda emitida por las lámparas tanto halógenas como LED típicas de los microscopios de campo claro. Entre estas tenemos a Giemsa, coloración usada ampliamente en el área de citogenética para la evaluación de cariotipo, capaz de revelar sitios ricos en Adenina y Timina. Diffquik, tinción usada en la evaluación de la morfología espermática capaz de detectar la zona nuclear. Feulgen, clásica tinción usada para cuantificar el ADN en muestras histológicas y FastBlast, tinción recientemente desarrollada por la compañía BioRad que permite revelar las bandas de ADN en geles de electroforesis sin necesidad de fluorescencia.

Ninguna de estas tinciones ha sido probada en la detección de ADN espermático en el bioensayo cometa pero sus aplicaciones anteriores permiten suponer que poseen una sensibilidad compatible con esta prueba.

La siguiente investigación tiene como propósito evaluar la compatibilidad de tinciones no fluorescentes de Diffquik, Giemsa, FastBlast y de Feulgen con el bioensayo cometa en el ADN espermático humano, para poder abaratar los costos y aumentar de esta manera su uso clínico a favor de los pacientes participantes en programas de reproducción asistida.

## II. MARCO TEORICO

### **Integridad del ADN espermático: Implicancias en la infertilidad**

Si tomamos en cuenta que la calidad seminal es el resultado de la interacción de multifactores como se ha explicado anteriormente y este puede ser medido solo con los parámetros establecidos por la OMS (motilidad, vitalidad, morfología y concentración) estamos siendo bastante sesgados ya que estamos dejando de lado a la variable responsable de la transmisión de la herencia, la integridad del ADN. El daño que se produce en el ADN de las células germinales es el responsable tanto de la no progresión de los embriones, abortos y malformaciones congénitas como la hidrocefalia e inclusive recientes estudios llegan a relacionarlo a una predisposición a cáncer infantil (Borini et al., 2006)(Simon & Lewis, 2011). La literatura sugiere la importancia del monitoreo de la integridad del ADN espermático como nuevo marcador de la calidad seminal y además como una variable a tomar en cuenta en los tratamientos de reproducción asistida ya que se ha corroborado que el potencial fértil de espermatozoide disminuye tanto *in vivo* como *in vitro*(Sun et al, 1997).Bajo estas razones se realiza una pequeña revisión para entender los factores envueltos en el daño a la integridad de ADN y su importancia en los tratamientos de reproducción asistida.

#### **Remodelación de la cromatina espermática**

A diferencia de la compactación de la cromatina de las células somáticas basada por octámeros de histonas en los espermatozoides existe un andamiaje proteico basado en unas proteínas llamadas protaminas de menor peso molecular(5-8 kD) pero ricas en residuos de arginina y cisteína que permiten un mejor anclaje del ADN y disminución del tamaño del núcleo basado en un alto número de puente disulfuro(Ward & Coffey, 1991). Todo el genoma haploide está organizado en loops de ADN y posee un promedio de 27 Kb todo unido a una estructura nuclear anular que convierten al núcleo del espermatozoide en una estructura supercondensada y protegida que garantiza una total transferencia de la información al ovocito(Barone et al,1994)

Buscando los inicios del daño genómico en los espermatozoides es fácil enfocar nuestra mirada en el complejo proceso de estrés causado por la condensación de la cromatina en la espermatogénesis, en el cual participa un complejo molecular formado por la endonucleasa Topoisomerasa II y las proteínas PARP/PARG, encargada de cortar y ligar bases libres que se

generan en los puntos de torsión de este arreglo, aproximadamente se generan un total de 5 a 10 millones de rupturas en las hebras dobles que permiten la liberación del ADN de las histonas y el posicionamiento correcto de las protaminas (Ward, 2011), estas rupturas son marcadas por eventos de fosforilación en sus histonas (Gamma-H2AX) para que luego las topoisomerasas liberen esa presión y se de ese balance de mantenimiento-reparación (Blanco-Rodríguez, 2012). Este marcador epigenético de mantenimiento-reparación parece expresarse post espermatogénesis y se puede apreciar en el aumento de la fosforilación de H2AX, cuando existen factores de estrés como el Peróxido de Hidrogeno capaz de liberar especies reactivas en oxígeno que atacan el armazón núcleo proteico de la cromatina, dejando en claro un mecanismo de señalización de daño para una futura reparación de parte del ovocito (Li et al, 2006).

Fallas en este proceso de remodelación pueden generar una retención mayor de histonas y un menor número de protaminas, induciendo un estado muy alto de vulnerabilidad y susceptibilidad a ataques de especies reactivas que tienen como fuente al ambiente mismo donde se sitúa el espermatozoide (Aitken & De Iulius, 2010).

## **Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es referido a la actividad negativa producida por los radicales libres OH y otros agentes oxidantes como Peróxido de Hidrogeno, este estrés puede provenir de fuente endógenas como una fuente exógena en el mismo espermatozoide (Nikitaki et al, 2015). Entre las fuentes exógenas cabe resaltar la gran cantidad de metales en transición que se encuentran en el plasma seminal y los radicales producidos por los leucocitos (Fortunato et al., 2013). Tanto los radicales libres, los iones férricos y cúpricos presentan una tendencia de pérdida y ganancia de electrones que terminan buscando un punto de anclaje covalente con diferentes moléculas ubicadas en la membrana celular del espermatozoide, paradójicamente la membrana plasmática contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que son proclives a un ataque de los radicales y conllevan una subsecuente peroxidación lipídica que no solo compromete la permeabilidad de la membrana sino también ataca al acrosoma, fundamental en la penetración de la zona pelúcida, dependiendo del nivel de estrés este daño puede comprometer a la activación de la vía de apoptosis con consecuencia a nivel nuclear (Sun et al., 1997). Otro punto de ataque para estos radicales es la misma zona nuclear preferentemente las zonas ricas en pirimidinas formando aductos que impiden la correcta unión entre las hebras y teniendo como consecuencia una activación previsible de la vía de apoptosis (González-Marín et al, 2012). Como agente exógeno cabe destacar que este daño puede ser causado normalmente por algún tipo de infiltración leucocitaria, ya que este tipo de células presentan la capacidad innata de liberar ROS para el control de patógenos, otro agente catalizador del aumento de ROS son factores como la

radiación UV u otro tipo de alteración ambiental que presente como consecuencia una inhibición de antioxidantes presentes en el líquido seminal(Aitken & De Iuliis, 2010)(Zöpfigen et al., 2000).

## **Detección de la fragmentación del ADN espermático**

Es importante destacar que a diferencia de otras células, los espermatozoides no presentan ningún tipo de actividad de reparación de su material genético(González-Marín et al., 2012), siendo células muy propensas a la oxidación por parte de las especies oxígeno reactivas (Agarwal & Said, 2003))

El ovocito es capaz de reparar roturas de una o de doble cadena de ADN espermático utilizando el mecanismo de escisión de bases y síntesis de nucleótidos “Sistema SOS”, Este mecanismo presenta un umbral de saturación y existen daños que no pueden ser reparados, estas anomalías en el genoma paterno originan problemas en estados tempranos de desarrollo del embrión (Ashwood-Smith & Edwards, 1996)(Tesarik, 2004). Esta modificación de sus bases y la acumulación de mutaciones conllevan tanto a problemas epigenéticos como genéticos relacionados a pérdidas del embrión o feto durante el embarazo (Sakkas et al ,1998)(Zini et al, 2008).

Siendo el espermatozoides la célula encargada de transportar la mitad del material genético para la formación del embrión es necesario un correcto monitoreo de su salud genómica para cualquier tipo de terapia de reproducción asistida y así lograr las mejores tasas de éxito (Simon et al., 2014).

Diferentes esfuerzos han sido realizados en búsqueda del desarrollo de técnicas que permitan la evaluación de la calidad genómica tanto de células somáticas como células germinales (Nikitaki et al., 2015)(Choi et al, 2015). El poder detectar y cuantificar el daño en el ADN en las células germinales abre un panorama esencial para el aseguramiento de la correcta transmisión de la información genética y se convierte en una herramienta necesaria para los tratamientos de reproducción asistida como de los programas de mejoramiento animal donde son primordiales diagnósticos que permitan tamizar a los espermatozoides idóneos del individuo (ASRM, 2008)(Cheuquemán et al., 2013)

Desde las primeras investigaciones Cook & Brazell, 1976 sobre la caracterización del modelo de la estructura núcleo-proteicas que contiene el ADN helicoidal y la capacidad que tiene esta en ser solubilizada y liberada a través de detergente no iónicos y una alta concentración de NaCl, sentó el precedente para el desarrollo de un número de técnicas que evalúen la integridad del ADN

El daño en el ADN espermático puede ser evaluado desde diferentes puntos de su compleja arquitectura mediante pruebas directas o indirectas, siendo una de las más importantes la prueba del ensayo cometa. La liberación del ADN y su característica formación de súper enrollamiento servirían de parámetro para que años más tarde Ostling & Johanson (1984) pudieran desarrollar una prueba que analice y cuantifique el daño al ADN expuesto a radiación en linfocitos a través de un ensayo en el cual las células estuvieron embebidas en agarosa y expuestas a campo eléctrico. Ellos basaron su hipótesis en que a mayor número de roturas en alguna de las hebras, mayor es la relajación de todo el ADN y también mayor la cantidad de fragmentos libres que se puede encontrar. Posteriormente McCoy & Schneider (1988) propusieron que si las células se exponían a un pH 13 se incrementaba la sensibilidad para detectar mínimas cantidades de daños en el ADN producidos por roturas en una o en doble cadena, siendo los primeros en denominar a esta prueba como ensayo cometa por la forma como se extienden los fragmentos, parecido a lo que sucede con el fenómeno astral. Esta técnica presenta numerosas variantes ya que al precipitar el ADN permite combinarla con sondas para detección de daños específicos no solo en a nivel del genoma global sino de cromosomas específicos (Cortés-gutiérrez, et al, 2011) (Pérez-García et al, 2015).

No es hasta el experimento de Hughes en 1997 que la técnica pudo ser usada para medir el daño en espermatozoides, esto se pudo gracias a ligeras variaciones metodológicas como el uso de un agente proteolítico como la proteinasa K que tiene como función eliminar la fuerte condensación de la protaminas típicas de los espermatozoides y un cambio a un buffer especializado para la osmolaridad de este tipo de células.

## **Tinciones sensibles al ADN**

La sensibilidad o capacidad de detección de las tinciones tanto fluorescentes o de campo claro al ADN recaen en la capacidad de unión o formación de complejos por diversos mecanismos en él. En este trabajo que tiene como objetivo evaluar las diferentes performance de diversas tinciones es necesario entender la manera en que las propuestas se relacionan con el ADN para poder comprender los resultados obtenidos.

La tinción elegida como patrón es el SybrGreen, tinción largamente utilizada en el ensayo cometa y en otras aplicaciones moleculares por su característica unión al ADN basada en su estructura química y bajo peso molecular que le permite intercalarse en el surco menor de la estructura del ADN con preferencia en sitios ricos en Adenina y Timina (Dragan et al., 2012). Presenta como ventaja, la alta capacidad de emisión lumínica mucho mayor a otros fluorocromos que permite aumentar más de 1000 veces su sensibilidad si es comparada al clásico

bromuro de etidio (Zipper, 2004). Este detalle permite ser utilizado para la cuantificación de ADN en muestras tan pequeñas como el genoma espermático (Garner et al, 1994).

Entre las tinciones evaluadas la coloración de Feulgen tal vez sea una de las tinciones más estudiadas y utilizadas en el ámbito de la citohistoquímica por presentar una característica de correlación directa de la intensidad de la coloración con respecto a la cantidad de ADN presente en la célula. Por más de 75 años esta tinción ha sido el "Goldstandard" para la cuantificación de ADN mediante citometría aplicada al estudio de ploidia en tumores, monitoreo de la actividad nuclear y división mitótica en tejidos fijados (Biesterfeld et al, 2011). Su actividad está basada en una hidrólisis ácida que tiene como objetivo retirar las bases purínicas de la desoxirribosa para exponer a los grupos aldehídos, los cuales forman un complejo con el reactivo de Schiff, el cual es fucsina ácida saturada de bisulfito de sodio, este último al reaccionar con los aldehídos recupera los enlaces dobles conjugados que otorgan el color de la Fucsina y forman como resultado un compuesto coloreado quinoideo (Chieco & Derenzini, 1999).

FastBlast es otra de las tinciones evaluadas, según su fabricante BioRad tiene como contenido un compuesto catiónico derivado de la familia de las tinciones Tiazínicas, el cual está cargado positivamente y se atrae a los grupos fosfatos que están cargados negativamente. Las tiazinas tienen como estructura básica un anillo de cuatro carbonos, una molécula de azufre y una de nitrógeno. FastBlast ha sido reportado como un novedoso colorante de bajo costo, seguro y de poco tiempo de acción en la tinción de bandas de ADN en electroforesis (Hamilton, 2006). En esta familia de las Tiazinas podemos encontrar tinciones como Azul de metileno, Azul de Toluidina, Azure A y B (Marshall et al, 1978). Entre estas combinaciones destaca la de Romanowsky, la cual combina una tinción tiazínica catiónica con otra aniónica, generalmente eosina Y, las cuales se unen a los mono nucleótidos y forman un complejo caracterizado por 2 moléculas de eosina y 1 moléculas de tiazina, con una pico de absorción de 580 generando ese color característico púrpura. En esta combinación podemos encontrar a tinciones clásicas muy útiles en hematología e histología como Wright, Giemsa y Diffquik, siendo estas dos investigadas en esta tesis.

Giemsa tiene como composición Azure A, Azure B y eosina Y y ha sido ampliamente usada en análisis citogenéticas por tener afinidad a zonas ricas de Adenina y Timina en la cromatina (Estandarte, 2012), inclusive ha sido reportado en otras técnicas que miden la integridad de ADN como "SCD" (Dispersión de Cromatina Espermática) (Dogan et al., 2015) (Fernández et al., 2005) (Muriel et al., 2006). Mientras Diffquik presenta como componente aniónico a Eosina G y catiónico a una tinción tiazínica no especificada y en el área de reproducción es usada usualmente para la evaluación de la morfología espermática y para la visualización de ADN espermático (Sousa et al., 2009) (Tavares et al., 2013).

### III. ANTECEDENTES

La eficiencia de la espermatogénesis en lo humanos es bastante pobre comparada con otros animales, se calcula que se produce 3 a 4 millones de espermatozoide por gramo de tejido testicular, con un volumen mínimo de 1.5 ml y apenas un 4% de todos estos son considerados normales(Johnson et al,984)(WHO, 2010) . Existen diferentes factores que influncian este proceso dentro de los cuales destacan los endocrinos y los factores socio-ambientales(Knapp & Innocent, 2012), teniendo como consecuencia variaciones en la morfología, motilidad ,integridad de ADN y maduración nuclear de los espermatozoides y por ende en su capacidad fértil entre los eyaculados considerados normospermicos(Gunalp et al, 2001)(Pastuszak & Lipshultz, 2012)(Franken & Joshi, 2015).Es así que Jenkins et al., 2014 evidencia que esta gran variabilidad incluso se ve reflejada en diferencias a nivel epigenético dentro de los sujetos considerados normozoospermicos. Esta heterogeneidad sigue siendo el problema más recurrente a nivel de los tratamientos de reproducción asistida ya que afecta las predicciones de éxito. Múltiples esfuerzos se vienen realizando para investigar un marcador más certero de diagnóstico de fertilidad masculina, es así que en estos últimos años se viene tomando en cuenta al nivel de integridad de ADN como un buen predictor confiable de tasas de embarazo e indicador calidad espermática(Sharma et al, 2015). En tratamientos como inseminación intrauterina ha demostrado tener una vital importancia ya que valores por debajo a 18% de la muestra basal predicen valores mínimos de fragmentación postcapacitación espermática que aseguran un éxito de embarazo(Yang et al., 2015)(Tomlinson, 2001)(Jayaraman, 2012). Dentro de las técnicas usadas para evaluar la integridad del ADN, el Ensayo cometa es una técnica muy útil que permite evaluar de manera exacta el daño en el ADN y la capacidad de reparación individual de cada célula(Villani et al., 2010)(Pérez-García et al., 2015). Ha sido utilizada en diferentes campos que van desde el análisis de genotoxicidad hasta su nuevo uso como diagnóstico de infertilidad (Lewis & Agbaje, 2008)(Liao et al,2009). Usualmente esta técnica es observada bajo tinciones fluorescentes capaces de acoplarse al ADN, lo cual requiere una fuente de iluminación especial y una cámara tipo CCD para la captura de imágenes. Lamentablemente las láminas no pueden ser almacenadas ya que estas tinciones suelen decaer en su fluorescencia con el paso del tiempo y tampoco la muestra puede ser reteñida ya que lo sitios donde se acopla la tinción siguen ocupados(Cromey, 2013).Bajo esta serie de inconvenientes algunos esfuerzos se han realizado en búsqueda de tinciones alternativas.

Entre las tinciones alternativas más estudiadas se encuentra la tinción argéntica, tinción desarrollada inicialmente por Korson, 1964 para la detección de zonas ricas en ácidos nucleicos en láminas histológicas. El principio de esta tinción se basa en la impregnación de la muestra con iones de plata  $Ag^+$  en condiciones acidas teniendo como fuente  $AgNO_3$  para una posterior

reducción a  $Ag^0$  en presencia de formaldehído. Goldman & Merrill, 1982 fueron los primeros en trabajar esta reacción para evidenciar bandas de ADN provenientes de electroforesis. De acuerdo a las modificaciones hechas por Bassam et al, 1991 en el tiempo de trabajo y pH se lograron resultados bastante óptimos teniendo una sensibilidad de detección menor o igual a  $1pg/mm^2$ , lo suficiente como para detectar el genoma total de un espermatozoide (Singh & Stephens, 1997). El grupo de Nadin et al, 2001 fueron los primeros en reportar el uso de esta tinción compatible con el bioensayo cometa, en su experimento encontraron una correlación de detección bastante parecida a la tinción fluorescente, Ioduro de Propidio. Las muestras fueron sometidas a un gradiente de Peróxido de Hidrógeno (0,30 y 60 mM), leídas mediante método visual y respondieron de igual manera en ambas tinciones mostrando nula diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). La reproducibilidad de este método alternativo fue probado por García et al., 2004 quien probó la sensibilidad y la variabilidad del método visual usando los resultados obtenidos por diferentes laboratorios en muestras expuestas a un gradiente de Peróxido de Hidrógeno (0,5, 10, 25, 50 y 100 mM) en un diseño experimental completamente randomizado obteniendo un coeficiente de variación bajo de 10% aproximadamente con respecto al control. Por otro lado la reproducibilidad del método automatizado también fue comprobado por el mismo grupo de García et al, 2007 utilizando el software CASP evaluando valores como momento de Olive y de cola, porcentaje de ADN en la cola y longitud de cola obteniendo valores similares reportados en la literatura (Yasuhara et al., 2003) (Noroozi et al 1998). Es necesario citar al trabajo de Osipov et al, 2014 quien en búsqueda de tinciones de rápido manejo probó la sensibilidad de detección Giemsa y Azure B en el bioensayo cometa comparándola con SybrGreen encontrando una similitud bastante cercana entre Giemsa y la tinción fluorescente ( $R^2 > 0.977$ ).

Hay que denotar que todos los ensayos mencionados fueron realizados en leucocitos y si bien la tinción argéntica ha demostrado ser bastante exacta y no presenta las desventajas de las tinciones fluorescentes aún no ha sido usada de forma rutinaria probablemente por lo costoso y laborioso de su realización (Braafladt, Reipa, & Atha, 2016).

Ante este escenario otras propuestas han sido probadas para la detección de ADN espermático, Carretero et al, 2012 y Fernández et al., 2003 proponen el uso de tinciones como Wright, Giemsa y Diffquik para evidenciar los halos típicos de la técnica SCD a su vez este último compara sus resultados con la tinción fluorescente DAPI observando patrones de ADN parecidos entre ambos grupos. Zhang et al., 2010 comparó no solo la sensibilidad de la tinción Diffquik para detectar ADN en la técnica de SCD sino su compatibilidad con la técnica TUNEL demostrando que esta tinción permite distinguir en mayor proporción el ADN íntegro usando la técnica SCD que la TUNEL.

Estas dos tinciones tienen como común denominador pertenecer a la familia de las tiazinas, coloraciones capaces de detectar el ADN, recientemente ha salido al mercado una tinción de esta

familia de bajo costo capaz de detectar ADN en electroforesis llamado FastBlast que también podría ser usado como una tinción alternativa(BioRAD, 2015). Otras posible tinción candidata sería la tinción de Feulgen la cual ha sido utilizada largamente en experimentos de cuantificación de ADN en microscopia electrónica, al ser capaz de unirse al ADN.(Takamatsu.T, 1980)(Pompella et al., 1987)

Lamentablemente no existe mucha información en la literatura sobre la sensibilidad de tinciones de campo sobre la detección de ADN espermático y su compatibilidad con el bioensayo cometa, este vacío científico merece ser llenado por tener alcances que benefician a los pacientes en el área de infertilidad.

## IV. METODOLOGIA

### **Lugar de ejecución**

La presente investigación ha sido realizada en el Laboratorio de biotecnología animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

### **Tipo y diseño de investigación:**

#### **Tipo de investigación y diseño de investigación**

La investigación es de naturaleza exploratoria. Para la determinación de la efectividad de las tinciones no fluorescentes de Giemsa, FastBlast, de Feulgen y la tinción fluorescente SybrGreen con el bioensayo cometa cada muestra fue expuesta a 4 cuatro concentraciones de Peróxido de Hidrogeno (0,10 mM,30 mM,60 mM y 100 mM) para luego ser teñida por SybrGreen, Diffquik, Giemsa, Feulgen y FastBlast y medir el coeficiente de daño y el porcentaje de ADN en la cola.

#### **Variables**

Las variables independientes son las diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrogeno (0, 30, 60 y 100 mM) y las tinciones SybrGreen, Diffquik, Giemsa, de Feulgen y Fast Blast. Las variables dependientes son el porcentaje el coeficiente de daño y el porcentaje de ADN en la cola. Además se tomó en cuenta al efecto de la variable aleatoria producida por la independencia de cada muestra.

## Operacionalización de las variables

Variable	Escala	Instrumento	Unidad de análisis	Definición
<b>Dependiente:</b> Coeficiente de daño	Cuantitativa	Software CASP	Espermatozoide	Registro de tamaño de la cola del cometa
<b>Dependiente:</b> Porcentaje de ADN en la cola	Cuantitativa	Software CASP	Espermatozoide	Medida de intensidad de la coloración de la cola
<b>Independiente:</b> Concentración de Peróxido de Hidrogeno	Cualitativa ordinal	-	Espermatozoide	0,10,30,60,100 mM
<b>Independiente:</b> Tinciones no Fluorescentes y SybrGreen	Cualitativa	-	Espermatozoide	Diffquick, Giemsa, de Feulgen, FastBlast y SybrGreen
<b>Aleatoria:</b>	Cuantitativa	Software SPSS	Valor p significativo	Efecto aleatorio de la naturaleza intrínseca de cada eyaculado

## Muestreo

Todos los participantes (N=35) estuvieron en un rango de 20 a 27 años, la muestra fue obtenida mediante masturbación, con un mínimo de 3 días de abstinencia sexual y evaluada mediante los criterios establecidos por el manual de la OMS 2010,

## Procedimiento:

### Determinación de la calidad espermática de los donadores

La concentración espermática se fijó en una alícuota de semen en solución Wiegmann 4%, se diluyó en una proporción 1:20 y se observó en la cámara de Neubauer a un aumento de 400X. Se aceptaron las muestras mayores a 20 millones de espermatozoides por mililitro. La motilidad fue observada usando 10 ul de muestra en un portaobjeto a un aumento de 400X en microscopio Nikon LaboPhot ,equipado con un sistema de captura en video, teniendo como criterio de inclusión las muestras mayores o iguales a 32% de espermatozoides progresivos.

Para la morfología espermática se realizó un frotis de la muestra, el cual fue teñido por 05 minutos utilizando la tinción DiffQuick, posteriormente se observó a 1000X bajo aceite de inmersión y se analizó en un microscopio Olympus® CX 21, aceptándose un valor mayor a 4% de espermatozoides normales. El volumen de la muestra fue medida utilizando pipeta Pasteur descartables, incluyéndose solo las muestras con un volumen mayor a 1.5 ml

### **Capacitación espermática**

Los eyaculados seleccionados (N=15), fueron colocados en un gradiente de Percoll-Silice (Nidacon®) formado por una fase de 55% y 80% y centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos y posteriormente fueron lavados con buffer Flushing (Origio®) suplementado con antibióticos.

### **Bioensayo Cometa**

Cada eyaculado seleccionado (N=15) fue expuesto a una concentración 0, 10, 30, 60 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por una hora a 4 °C para la producción de daño genómico. Se procedió a la evaluación de la fragmentación de ADN en forma visual y automatizada utilizando las tinciones SybrGreen, Diffquik, Giemsa, Fast Blast y de Feulgen respectivamente.

Para el bioensayo cometa se usó una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra, la cual fue diluida hasta obtener una dilución de 10 millones de espermatozoides por mililitro. Luego 25  $\mu\text{l}$  de dilución, fueron mezcladas con 75  $\mu\text{l}$  de agarosa semisólida de bajo punto de fusión al 1%. Esta suspensión fue vertida en placas pre tratadas con agarosa solidificada al 0.65% y se cubrieron cuidadosamente con el cubreobjetos hasta la solidificación de la mezcla a 4 °C para luego retirar el cubreobjetos. Las láminas se incubaron por 1 hora a 4 °C en una solución de lisis (2.5M NaCl, 1% SDS, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X 100, 10% DMSO, pH 10) para luego incubarla en una solución de digestión (2.5M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X 100, 10% DMSO, Proteinasa K 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pH 10) a 37 °C toda la noche. Luego las láminas fueron equilibradas en la bandeja de electroforesis horizontal en buffer de 300mM NaOH y 1 mM EDTA para favorecer el desenrollamiento del ADN. La muestra fue corrida a 25 V y 300 mA por 10 minutos y luego fue neutralizada por 15 minutos en (0.4 M Tris-HCl pH 7).

Las 5 láminas correspondientes a cada muestra (N=15) expuestas a las diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrogeno (0, 10, 30, 60 y 100 mM) fueron teñidas en las tinciones correspondientes. Para SybrGreen se usó las instrucciones provistas por el fabricante. 1  $\mu\text{l}$  de SybrGreen de 10000 X en 10 mL TE buffer pH 7.5 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) por media hora en un vaso Coplin, de igual manera con Diffquik se siguió un protocolo que incluyó una inmersión en 5 minutos en solución de fijación, 5 en solución A y 5 en B.

Para FastBlast, la lámina fue teñida usando una dilución de 1X a partir de 1 ml de Fast Blast 500x diluido en 499 ml de agua desionizada, la muestra fue incubada por 8 horas a temperatura ambiente y visualizada posteriormente, protegiéndolo de la luz directa. Con Feulgen, la lámina fue embebida en HCl 1N frío por 1 minuto, luego en HCl 5N por una hora, para ser lavada luego con agua destilada y sumergida en reactivo de Schiff por 45 minutos a temperatura ambiente, se lavó delicadamente con agua destilada para ser teñida con Green Light al 1% por 1 minuto para

posteriormente ser deshidratada en etanol 90% por 5 minutos. Finalmente Giemsa la solución de Giemsa por 30 minutos para luego ser lavada en buffer Sorensen fosfato pH 6.8.

Para la medición de la fragmentación mediante el método visual la unidad de valoración arbitraria fue la medida del coeficiente de daño que se obtuvo usando la siguiente fórmula:

$$CD = [(\#C \ G0x0) + (\#C \ G1x1) + (\#C \ G2x2) + (\#C \ G3x3) + (\#C \ G4x4)]$$

Donde #C es el Número de células y G el Grado de daño

- Grado 0 = Tamaño de la cola menor al 5% del total de la célula.
- Grado 1 = Tamaño de la cola mayor al 5% y menor al 20% del total de la célula.
- Grado 2 = Tamaño de la cola mayor al 20% y menor al 40% del total de la célula
- Grado 3 = Tamaño de la cola mayor al 40% y menor al 95% del total de la célula
- Grado 4 = Tamaño de la cola mayor 95% de la célula con un núcleo poco definido

Se contaron 100 células por muestra a un aumento de 400X para el cálculo del coeficiente de daño.

Para el método automatizado, 100 células fueron contadas por muestra y las imágenes fueron adquiridas utilizando una cámara tipo CMO, Moticom 5 (Motic®), un microscopio de fluorescencia BX 53 (Olympus®) y procesadas usando el software CASP® especializado para ensayo cometa y se tomó como unidad el porcentaje de ADN en la cola.

## **Análisis de datos**

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS versión 22.0 para Windows 7 con un 95% de confiabilidad. Se realizó un ajuste al modelo de regresión lineal para cada tinción donde las concentraciones de Peróxido de hidrógeno fueron asignadas al eje X, el coeficiente de daño y % de ADN en la cola al eje Y. Se cuantificó efectividad de cada tinción tomando en cuenta el promedio de Valor de ajuste R de regresión y en búsqueda de evidenciar diferencias estadísticas significativas entre estos valores obtenidos se realizó un análisis en el modelo estadístico lineal generalizado univariante.

## **Aspecto ético**

Cada participante(N=35) fue informado de la finalidad del uso de su muestra, sus datos se mantuvieron en confidencialidad asignándose un código para cada uno que participó voluntariamente expresando su conformidad mediante un consentimiento informado.

## V. RESULTADOS

### **Obtención de una población espermática homogénea**

Para el estudio se utilizaron eyaculados de 35 personas, los valores de cada individuo se encuentran expresados en la Tabla N° 1. En la Tabla N° 2 se encuentran los estadísticos descriptivos para cada variable correspondiente.

De las 35 muestras, 15 fueron seleccionadas las cuales cumplieron con los requisitos establecidos y se encuentran resaltadas en la Tabla N° 1. En la Tabla N° 3 se observa la mejora de la motilidad post capacitación, obteniéndose un aumento de 48.5% a 96,3% con una diferencia significativa  $p < 0.01$  y una alta homogeneidad demostrada por el valor de la desviación estándar. A su vez esta afirmación puede ser observada en el Figura de cajas de la media de las 2 poblaciones (Figura 2).

Se logró obtener una población espermática homogénea adecuada para los propósitos de la experimentación apoyado en el modelo general lineal univariado que demostró que no existió injerencia de alguna variable aleatoria en los resultados.

### **Determinación de la capacidad de detección fragmentación de ADN de las tinciones no fluorescentes de Diffquik Giemsa, Fast Blast, de Feulgen y la tinción fluorescente SybrGreen con el bioensayo cometa en el método visual**

Diffquik, Giemsa y el control SybrGreen fueron las únicas tinciones que lograron evidenciar la fragmentación de ADN. Los patrones de fragmentación de cada tinción son mostrados en la Figura 1. Tanto Fast Blast como Feulgen no lograron teñir en ninguna de las concentraciones de Peróxido de Hidrogeno y por lo tanto no fueron tomadas en cuenta para el análisis estadístico de las variables. En la Tabla N° 4 se describen los valores estadísticos de coeficiente de daño detectado por cada tinción en cada concentración de Peróxido de Hidrogeno.

La tinción Giemsa como Diffquik presentan valores de detección de coeficiente de daño por debajo de SybrGreen en cada una de las concentraciones, esta tendencia se puede verificar en el Figura 3 y Tabla N° 5 al comparar las pendientes (m) de las regresiones lineales de coeficiente de daño de cada tinción con respecto a las concentraciones de Peróxido de Hidrogeno, obteniendo un valor de  $m = 3,67$  para SybrGreen; seguido por un valor  $m = 3,45$  de Giemsa y un  $m = 2,57$  de Diffquik. Esta gradiente de afinidad es apoyada por los valores de ajuste(R) que

muestran el nivel de correlación que tienen cada tinción hacia al modelo de tipo dosis respuesta y por el Figura 4 que muestra la comparación de medias marginales del coeficiente de daño.

Estos resultados son confirmados mediante el modelo lineal general univariado, cuyos valores pueden ser observados en la Tabla N° 6, lo que indica que existe una diferencia significativa al comparar la efectividad de detección de SybrGreen frente a las demás concentraciones. Se puede observar además que cuando se compara SybrGreen con Giemsa la diferencia es menor pero significativa y está basada en los niveles de detección a partir de 60 mM de ambas tinciones (Figura 3 y 4). Este modelo nos indica que los resultados obtenidos son independientes a la muestra y su efecto aleatorio, demostrando que no existe ningún tipo de sesgo en los resultados.

#### **Determinación de la capacidad de detección de fragmentación de ADN de la tinción no fluorescentes de Diffquik Giemsa, Fast Blast, de Feulgen y la tinción fluorescente SybrGreen con el bioensayo cometa en el método automatizado**

La Tabla N° 7 muestra los valores descriptivos del porcentaje de ADN detectado en la cola usando cada tinción en las diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrogeno. Se muestra una similitud de detección de porcentaje de ADN en la cola por parte de la tinción Sybrgreen y Giemsa y mientras que Diffquik presenta valores por debajo de las otras tinciones.

Este patrón es observado en el Figura 5 y Tabla N° 8 al comparar las pendientes de las regresiones lineales del porcentaje de ADN en la cola para cada tinción con respecto a las concentraciones de Peróxido de Hidrogeno, obteniendo un valor de  $m=0,83$  para SybrGreen; seguido por  $m=0,79$  de Giemsa y un  $m=0,77$  de Diffquik. Sin embargo solo se muestra una afinidad alta de parte de Sybrgreen y Giemsa al tener valores de R mayores a 0,92 confirmando que además de una baja respuesta de detección Diffquik, sus valores son heterogéneos y no fiables en las diferentes concentraciones.

Esta falta de efectividad por parte de Diffquik puede ser observada a mayor detalle en el Figura 6 que muestra la comparación de medias marginales del porcentaje de ADN en la cola detectados por cada tinción. Se puede observar además que a pesar que existe una superposición de las tendencias en SybrGreen y Giemsa en la efectividad de detección de ADN en la cola, existe un punto de bifurcación denotando un umbral de detección en 60 mM. Los resultados anteriores son confirmados mediante el modelo lineal general univariado, donde se observan todas las interacciones en la Tabla N° 9, lo que indica que existe una diferencia significativa al comparar la efectividad de detección de SybrGreen frente a las demás concentraciones ( $p<0.01$ ). Respecto a las tinciones Giemsa y Diffquik se puede ver que existe una significancia importante con un valor de  $p<0.01$ . Esta diferencia se puede observar en el Figura 6 donde las

líneas de tendencia coinciden solo en el valor 60 mM difiriendo en todas las demás concentraciones de Peróxido de Hidrogeno y muestra además una superioridad en la capacidad de detectar porcentaje de ADN en la cola por parte de la tinción Giemsa. Este modelo nos indica que los resultados obtenidos son independientes a la muestra y su efecto aleatorio, demostrando que no existe ningún tipo de sesgo en los resultados ( $p > 0.05$ ).

## VI. DISCUSIÓN

Los resultados muestran una alta heterogeneidad en las 35 muestras, caracterizadas con amplios rangos y desviaciones estándar para cada variable cuantificada. Estos resultados están de acuerdo a lo observado por Jenkins et al., 2014 quien fundamenta sus resultados en los diferentes niveles integridad de ADN, de expresión genética y hasta epigenéticas de las células germinales y acompañantes. Cabe resaltar que las muestras que cumplieron con todos los requisitos establecidos tuvieron como principales características una motilidad media de 45,5% y una morfología que va desde el 4% al 12%, estos resultados coinciden con los grupos de normozoospermicos descritos por Gunalp et al, 2001 y Pastuszak & Lipshultz, 2012.

Las muestras seleccionadas fueron tamizadas usando el método de gradiente de densidad, teniendo como resultado una población de 96,3% de motilidad. Este resultado es superior al obtenido por Tomlinson, 2001 y Jayaraman et al, 2012, los cuales obtuvieron una media de 95% de espermatozoides motiles. Podemos inferir que todas las muestras seleccionadas son muestras de bajo nivel de daño genómico; tomando como antecedentes los trabajos de Yang et al., 2015 que demostraron que las muestras con espermatozoides de motilidad mayor al 95% obtenido por gradiente de densidad presentaban un índice de fragmentación genómica menor al 5%. Los resultados post capacitación muestran una diferencia estadística notable con respecto a la muestras normozoospermicas ( $p < 0.01$ ), una alta homogeneidad intermuestral con una desviación estándar de 1.23 denotando que se logró cumplir con un buen tamizaje y un grupo idóneo para la experimentación.

Aunque se tenga un conjunto de muestras homogéneas es importante tomar en cuenta que estas provienen de diferentes individuos y por lo tanto generan en el diseño experimental una variable aleatoria la cual puede afectar de alguna manera los resultados. Este detalle ya ha sido observado en trabajos que pretendían demostrar diferentes sensibilidades de métodos de análisis en el área de reproducción, específicamente, andrología donde se enmarca esta investigación (Franken & Joshi, 2015) (Sharma et al, 2015) (Carretero et al., 2012). Nuestros resultados indican que no existe ningún tipo de influencia de esta variable aleatoria al no existir una interacción significativa ( $p > 0.05$ ) con las variables respuestas confirmando la obtención de una muestra adecuada para los propósitos de esta investigación.

La tinción de Feulgen no logro teñir la estructura de los espermatozoides como el ADN. Una de las causas podría ser el pH al que se lleva la reacción de Feulgen, teniendo en cuenta que la reacción de hidrolisis acida se realiza a aproximadamente 1.5, esta ha podido ser afectada por el mismo proceso del bioensayo cometa el cual se lleva a cabo a un pH de 10. Aunque se realice una neutralización con Tris-HCl, esta alcalinización previa pudo haber afectado la estructura de las purinas y evitar así su desplazamiento para la exposición de aldehídos donde se realiza la unión. Takamatsu.T, 1980 observó este fenómeno a nivel de microscopia electrónica en células

que poseían gran cantidad de citoplasma y estas al producir metabolitos alcalinos bloqueaban la exposición de los aldehídos y evitaban la unión a la coloración. Otra limitante de esta tinción radica en las observaciones de Pompella et al, 1987, el cual experimento con la actividad de agentes fuertemente oxidantes, lo cual genera una lipoperoxidación en la membrana celular y produce gran cantidad de aldehídos los cuales serían teñidos con gran afinidad disminuyendo así la sensibilidad de la tinción por el ADN. Este detalle es de suma importancia ya que una de las causas importantes de la fragmentación del ADN es la lipoperoxidación lipídica de la membrana celular y camuflar la intensidad en la membrana celular sesgaría los resultados tanto visuales como automatizados.

Por otro lado, no se evidenció ningún espermatozoide teñido tanto a nivel estructural y de ADN con la coloración FastBlast, la explicación estaría en la sensibilidad de la coloración ya que este presenta como punto de corte un valor inferior de 50 ng de ADN para su detección (BioRAD, 2015), un concentración bastante baja para la formación de una banda en una electroforesis convencional pero difícil de alcanzar en una electroforesis unicelular ya que un espermatozoide humano presenta una cantidad de aproximadamente 37.5 MB cantidad mucho menor a 1 ng (Singh & Stephens, 1997).

Tanto Giemsa como Diffquik fueron capaces de evidenciar el ADN y su migración pero presentaron diferencias entre sí y con el control tanto para el parámetro visual como en el automatizado.

La reacción positiva de Giemsa ya había sido estudiada anteriormente, Osipov et al, 2014 corroboró que esta tinción era compatible con el bioensayo cometa usando una metodología automatizada, mediante la tinción de linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de rayos gamma. A diferencia, utilizó un número pequeño de muestras  $N = 3$  con 3 repeticiones cada una y tomó como parámetro de sensibilidad la pendiente de la curva dosis respuesta de % de ADN en la cola. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación, ya que él observa una diferencia significativa en todas las concentraciones marcadamente en la más alta (6Gy) de radiación de parte de SybrGreen con respecto Giemsa y un valor de 1.2 veces más sensibilidad de parte del SybrGreen con respecto a Giemsa. Si bien los resultados de esta investigación no calculan esta última ponderación, el resultado se puede obtener dividiendo el valor de la pendiente de SybrGreen entre la de Giemsa y en el caso de la metodología automatizada tendría como resultado 1.05 veces más efectividad de SybrGreen respecto a Giemsa y en la metodología visual el valor de 1.06 veces más, valores incluso más cercanos que los obtenidos en la experiencia de Osipov et al., 2014.

El modelo Lineal generalizado univariante indica que no existe una similitud entre Giemsa y SybrGreen tanto en la medición visual (Coeficiente de Daño) y automatizada (Porcentaje de ADN en la Cola), sin embargo observando las medias marginales en ambos casos podemos notar

que esta diferencia se basa en la capacidad de detección a altas concentraciones de Peróxido. Es necesario mencionar que fisiológicamente tanto células somáticas como espermatozoides expuestos a concentraciones altas como 60 y 100 mM presentan un nivel de oxidación que compromete totalmente su funcionamiento haciendo irrelevante buscar una diferencia de detección por parte de las tinciones propuestas ya que ambas están en un proceso de apoptosis y presentan el DNA completamente fragmentado e imposible de ser rescatado por alguna intervención del ovocito (Villani et al., 2010)(Pérez-García et al., 2015). Esto permite proponer que Giemsa es una alternativa a la tinción de fluorescencia SybrGreen en la detección de ADN espermático humano usando el método visual y automatizado en el ensayo cometa.

Diffquik también presenta una potencialidad grande, sobre todo pensando en el tiempo que toma colorear una muestra de aproximadamente 5 minutos. Volviendo al mismo ejercicio del cálculo de efectividad, SybrGreen presenta un valor de 1,07 veces más de efectividad en el automatizado y un valor de 1.44 veces en el visual con respecto a Diffquik. Esto podría explicarse por el hecho que el porcentaje de ADN es calculado mediante el algoritmo del programa que binariza los colores y cuantifica en una escala de grises la imagen, quitándole cualquier tipo de subjetividad producida por el analista(Braafladt et al, 2016). Hay que tomar en cuenta que la naturaleza de Diffquik presenta un diferente tono a la coloración de Giemsa al tener otra combinación Romanowsky, ligeramente más clara y más pegada al espectro ultravioleta dificultando su uso en la valoración visual. Esto puede ser observado al comparar las pendientes de ambas, demostrando en el método visual Giemsa es 1.38 más sensible que Diffquik, sin embargo solo 1.07 más sensible en el método automatizado. Esto indica que Diffquik podría ser usado como una alternativa de SybrGreen en el método automatizado, presentando una ventaja de tiempo de procesamiento y costo de operatividad.

## VII. CONCLUSIONES

La tinción de Feulgen no presenta ninguna de compatibilidad con el ensayo cometa al no ser capaz de evidenciar el ADN espermático.

La tinción FastBlast no presenta ninguna compatibilidad con el ensayo cometa al no ser capaz de evidenciar el ADN espermático.

Existe una diferencia de sensibilidad tanto en el método visual como en el método automatizado entre las tinciones Giemsa, Diffquik y SybrGreen.

Giemsa presenta una mayor sensibilidad basado en la pendiente de la dosis respuesta que Diffquik tanto en el método visual como automatizado.

Giemsa es una alternativa a la tinción de fluorescencia SybrGreen tanto para el método visual como automatizado, aun existiendo una diferencia estadística entre ambas demostrando una compatibilidad con el ensayo cometa.

Diffquik es una alternativa a la tinción de fluorescencia SybrGreen solo para el método automatizado, aun existiendo diferencias estadísticas entre ambas

## VIII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Agarwal, A., & Said, T. M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmg027>
- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, *16*(1), 3–13. <http://doi.org/10.1093/molehr/gap059>
- Ashwood-Smith, M. J., & Edwards, R. G. (1996). DNA repair by oocytes. *Molecular Human Reproduction*, *2*(1), 46–51.
- ASRM. (2008). The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertility and Sterility*, *90*(5), S178–S180. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.054>
- Barone, J. G., De Lara, J., Cummings, K. B., & Ward, W. S. (1994). DNA organization in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, *15*(2), 139–44. <http://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1994.tb00419.x>
- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *196*(1), 80–83. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90120-I](http://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90120-I)
- Biesterfeld, S., Beckers, S., Del Carmen Villa Cadenas, M., & Schramm, M. (2011). Feulgen staining remains the gold standard for precise DNA image cytometry. *Anticancer Research*, *31*(1), 53–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21273580>
- BioRAD. (2015). *Fast Blast™ DNA Stain. Instruction Manual*.
- Blanco-Rodriguez, J. (2012). Programmed phosphorylation of histone H2AX precedes a phase of DNA double-strand break-independent synapsis in mouse meiosis. *Reproduction*, *144*(6), 699–712. <http://doi.org/10.1530/REP-12-0326>
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M. A., Fava, L., Flamigni, C., & Coticchio, G. (2006). Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction*, *21*(11), 2876–2881. <http://doi.org/10.1093/humrep/del251>
- Braafladt, S., Reipa, V., & Atha, D. H. (2016). The Comet Assay: Automated Imaging Methods for Improved Analysis and Reproducibility. *Scientific Reports*, *6*(October 2015), 32162. <http://doi.org/10.1038/srep32162>

- Carretero, M. I., Lombardo, D., Arraztoa, C. C., Giuliano, S. M., Gambarotta, M. C., & Neild, D. M. (2012). Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Animal Reproduction Science*, *131*(1–2), 63–71. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.008>
- Cook, P. R., & Brazell, I. A. (1976). Characterization of nuclear structures containing super helical DNA. *Journal of Cell Science*, *22*, 303–324.
- Cortés-gutiérrez, E. I., Dávila-rodríguez, M. I., Fernández, J. L., Gosálbez, A., & Gosálvez, J. (2011). New Application of the Comet Assay: Chromosome – Comet Assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *59*(7), 655–660. <http://doi.org/10.1369/0022155411410884>
- Cromey, D. W. (2013). *Cell Imaging Techniques*. (D. J. Taatjes & J. Roth, Eds.) *Methods Mol Biol.* (Vol. 931). Totowa, NJ: Humana Press. <http://doi.org/10.1007/978-1-62703-056-4>
- Cheuquemán, C., Merino, O., Giojalas, L., Von Baer, A., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2013). Assessment of Sperm Function Parameters and DNA Fragmentation in Ejaculated Alpaca Sperm ( *Lama Pacos* ) by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, *48*(3), 447–453. <http://doi.org/10.1111/rda.12096>
- Chieco, P., & Derenzini, M. (1999). The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and Cell Biology*, *111*, 345–358. <http://doi.org/10.1007/s004180050367>
- Choi, J.-H., Kim, S.-Y., Kim, S.-K., Kemp, M. G., & Sancar, A. (2015). An Integrated Approach for Analysis of the DNA Damage Response in Mammalian Cells: NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR, DNA DAMAGE CHECKPOINT, AND APOPTOSIS. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(48), 28812–21.
- Dogan, S., Vargovic, P., Oliveira, R., Belser, L. E., Kaya, A., Moura, A., ... Memili, E. (2015). Sperm Protamine-Status Correlates to the Fertility of Breeding Bulls. *Biology of Reproduction*, *92*(4), 92–92. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124255>
- Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., ... Geddes, C. D. (2012). SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, *22*(4), 1189–1199. <http://doi.org/10.1007/s10895-012-1059-8>
- Estandarte, A. K. C. (2012). *A Review of the Different Staining Techniques for Human Metaphase Chromosomes*. University College of London.
- Fernandez, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test : A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, *24*(1), 59–66.

- Fernández, J. L., Ph, D., Muriel, L., Ph, D., Goyanes, V., & Ph, D. (2005). CONTROVERSY : SPERM DNA FRAGMENTATION Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, 84(4), 833–842. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.089>
- Fortunato, A., Leo, R., Casale, S., Nacchia, G., Liguori, F., & Tosti, E. (2013). Sperm DNA Fragmentation Assays Correlate with Sperm Abnormal Morphology and the Pregnancy Outcome. *J IVF Reprod Med Genet*, 1(1), 1–6. <http://doi.org/10.4172/jfiv.1000101>
- Franken, D. R., & Joshi, C. (2015). Sperm morphology training in India. *Andrologia*, 47(8), 932–934. <http://doi.org/10.1111/and.12358>
- García, O., Mandina, T., Lamadrid, A. I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, Y., ... Alvarez, A. (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556(1–2), 25–34. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.035>
- Garcia, O., Romero, I., González, J. E., & Mandina, T. (2007). Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(2), 186–190. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.11.007>
- Garner, D. L., Johnson, L. a, Yue, S. T., Roth, B. L., & Haugland, R. P. (1994). Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology*, 15(6), 620–629. <http://doi.org/SYBR-14, propidium iodide, vital dyes, sperm, staining>
- Goldman, D., & Merril, C. R. (1982). Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: Linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis*, 3(1), 24–26. <http://doi.org/10.1002/elps.1150030105>
- González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International Journal of Molecular Sciences*. <http://doi.org/10.3390/ijms131114026>
- Gunalp, S., Onculoglu, C., Gurgan, T., Kruger, T. F., & Lombard, C. J. (2001). A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(1), 110–114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139547>
- Hamilton.K. (2006). Amplification of chloroplast DNA using the polymerase chain reaction(PCR): a practical activity for secondary school student. *JBE*, 40(1), 172–177.

- Hughes, C. M. (1997). Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, 374(1), 261–268.
- Jayaraman, V., Upadhyaya, D., Narayan, P. K., & Adiga, S. K. (2012). Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(6), 557–563. <http://doi.org/10.1007/s10815-012-9742-x>
- Jenkins, T. G., Aston, K. I., Trost, C., Farley, J., Hotaling, J. M., & Carrell, D. T. (2014). Intra-sample heterogeneity of sperm DNA methylation. *Molecular Human Reproduction*, 21(4), 313–319. <http://doi.org/10.1093/molehr/gau115>
- Johnson, L., Petty, C. S., & Neaves, W. B. (1984). Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 211–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6694139>
- Knapp, L. A., & Innocent, S. H. S. (2012). Molecules and Mating: Positive Selection and Reproductive Behaviour in Primates. In C. López-Larrea (Ed.), *Sensing in Nature* (pp. 218–236). inbook, New York, NY: Springer US. [http://doi.org/10.1007/978-1-4614-1704-0\\_14](http://doi.org/10.1007/978-1-4614-1704-0_14)
- Korson, R. (1964). A silver stain for deoxyribonucleic acid. *J Histochem Cytochem*, 12(1), 875–879.
- Lewis, S. E. M., & Agbaje, I. M. (2008). Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis*, 23(3), 163–170. <http://doi.org/10.1093/mutage/gem052>
- Li, Z., Yang, J., & Huang, H. (2006). Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS Letters*, 580(26), 6161–6168. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.016>
- Liao, W., McNutt, M. a, & Zhu, W. (2009). The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), 46–53. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.016>
- Marshall, P. N., Bentley, S. a, & Lewis, S. M. (1978). Staining properties and stability of a standardised Romanowsky stain. *Journal of Clinical Pathology*, 31(3), 280–2. <http://doi.org/10.1136/jcp.31.3.280>
- Mccoy, T., & Schneider, E. L. (1988). Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells ', 175, 184–191.
- Muriel, L., Meseguer, M., Fernández, J. L., Alvarez, J., Remohí, J., Pellicer, A., ... Coruña, A. (2006). Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in

intrauterine insemination : a blind prospective study \*, 21(3), 738–744.  
<http://doi.org/10.1093/humrep/dei403>

Nadin, S. B., Roig, L. M. V., & Ciocca, D. R. (2001). A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(9)

Nikitaki, Z., Hellweg, C. E., Georgakilas, A. G., & Ravanat, J.-L. (2015). Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Frontiers in Chemistry*, 3(June), 35.  
<http://doi.org/10.3389/fchem.2015.00035>

Noroozi, M., Angerson, W. J., & Lean, M. E. (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 67(6), 1210–1218.  
Retrieved from  
<https://login.ezproxy.endeavour.edu.au:2443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=9625095&site=eds-live&scope=site>

Osipov, A., Arkhangelskaya, E., Vinokurov, A., & Smetanina, N. (2014). DNA Comet Giemsa Staining for Conventional Bright-Field Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 6086–6095. <http://doi.org/10.3390/ijms15046086>

Ostling, O., & Johanson, K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298.

Pastuszak, A. W., & Lipshultz, L. I. (2012). Re: Human semen quality in the new millennium: A prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *European Urology*, 62(6), 1197–1198. <http://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.09.018>

Pérez-García, C., Rouxel, J., & Akcha, F. (2015). Development of a comet-FISH assay for the detection of DNA damage in hemocytes of *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 161, 189–195.  
<http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.022>

Pompella, A., Maellaro, E., Casini, A. F., & Comporti, M. (1987). Histochemical detection of lipid peroxidation in the liver of bromobenzene-poisoned mice. *The American Journal of Pathology*, 129(2), 295–301. Retrieved from  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1899716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Sakkas, D., Urner, F., Bizzaro, D., & Manicardi, G. (1998). Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure : effect on fertilization and embryo development, 13.

Sharma, R., Kattoor, A. J., Ghulmiyyah, J., & Agarwal, A. (2015). Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(1), 1–12. <http://doi.org/10.3109/19396368.2014.976720>

Simon, L., & Lewis, S. E. M. (2011). Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 57(September 2010), 133–138. <http://doi.org/10.3109/19396368.2011.553984>

Simon, L., Liu, L., Murphy, K., Ge, S., Hotaling, J., Aston, K. I., ... Carrell, D. T. (2014). Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment, 29(5), 904–917. <http://doi.org/10.1093/humrep/deu040>

Singh, N. P., & Stephens, R. E. (1997). Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutation Research - DNA Repair*, 383(2), 167–175. [http://doi.org/10.1016/S0921-8777\(96\)00056-0](http://doi.org/10.1016/S0921-8777(96)00056-0)

Sousa, A. P. M., Tavares, R. S., Velez De La Calle, J. F., Figueiredo, H., Almeida, V., Almeida-Santos, T., & Ramalho-Santos, J. (2009). Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Human Reproduction*, 24(1), 28–36. <http://doi.org/10.1093/humrep/den365>

Sun, J. G., Jurisicova, A., & Casper, R. F. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 56(3), 602–7. <http://doi.org/10.1095/biolreprod56.3.602>

Takamatsu, T. (1980). Nonspecific dye-binding in the Feulgen nuclear stain and its blocking by Azocarmin G. *Histochemistry*, 66(1), 169–180.

Tavares, R. S., Silva, A. F., Lourenço, B., Almeida-Santos, T., Sousa, A. P., & Ramalho-Santos, J. (2013). Evaluation of human sperm chromatin status after selection using a modified Diff-Quik stain indicates embryo quality and pregnancy outcomes following in vitro fertilization. *Andrology*, 1(6), 830–837. <http://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00127.x>

Tesarik, J. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 19(3), 611–615. <http://doi.org/10.1093/humrep/deh127>

Tomlinson, M. J. (2001). Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction*, 16(10), 2160–2165. <http://doi.org/10.1093/humrep/16.10.2160>

Villani, P., Eleuteri, P., Grollino, M. G., Rescia, M., Altavista, P., Spanò, M., ... Cordelli, E. (2010). Sperm DNA fragmentation induced by DNase I and hydrogen peroxide: An in vitro comparative study among different mammalian species. *Reproduction*, *140*, 445–452. <http://doi.org/10.1530/REP-10-0176>

Ward, W. S. (2011). Regulating DNA Supercoiling: Sperm Points the Way. *Biology of Reproduction*, *84*(5), 841–843. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.111.090951>

Ward, W. S., & Coffey, D. S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*, *44*(4), 569–74. <http://doi.org/10.1095/biolreprod44.4.569>

WHO. (2010). *Examination and processing of human semen* (Fifth Edit). Switzerland.

Yang, Q., Zhang, N., Zhao, F., Zhao, W., Dai, S., Liu, J., ... Sun, Y. (2015). Processing of semen by density gradient centrifugation selects spermatozoa with longer telomeres for assisted reproduction techniques. *Reproductive BioMedicine Online*, *31*(1), 44–50. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.02.016>

Yasuhara, S., Zhu, Y., Matsui, T., Tipirneni, N., Yasuhara, Y., Kaneki, M., ... Martyn, J. A. J. (2003). Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *51*(7), 873–85. <http://doi.org/10.1177/002215540305100703>

Zhang, L., Sc, M., Qiu, Y., Wang, K., Ph, D., & Wang, Q. (2010). Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick- end labeling assay. *Fertility and Sterility*, *94*(3), 1027–1032. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.034>

Zini, A., Boman, J. M., Belzile, E., & Ciampi, A. (2008). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis, *23*(12), 2663–2668.

Zipper, H. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, *32*(12), e103–e103. <http://doi.org/10.1093/nar/gnh101>

Zöpfigen, A., Priem, F., Sudhoff, F., Jung, K., Lenk, S., Loening, S. A., & Sinha, P. (2000). Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *15*(4), 840–845. <http://doi.org/10.1093/humrep/15.4.840>

## IX. ANEXOS

**Tabla N° 1.**

Parámetros seminales evaluados de 35 sujetos, se resalta en amarillo los aceptados para la experimentación.

Cod	Edad	Abs (días)	Vol(ml)	C Spz*10 <sup>6</sup>	% de mot progresiva	% de mot in situ	% spz inmóviles	Leucocitos *10 <sup>6</sup>	% Morfo
<b>1</b>	<b>26</b>	<b>3</b>	<b>3.2</b>	<b>41</b>	<b>54%</b>	<b>10%</b>	<b>36%</b>	<b>0</b>	<b>4%</b>
2	25	4	3.1	37	14%	5%	81%	1	5%
<b>3</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	<b>5.9</b>	<b>134</b>	<b>47%</b>	<b>19%</b>	<b>34%</b>	<b>1</b>	<b>5%</b>
<b>4</b>	<b>23</b>	<b>5</b>	<b>1.7</b>	<b>104</b>	<b>50%</b>	<b>15%</b>	<b>35%</b>	<b>0</b>	<b>7%</b>
5	25	3	0.5	144	41%	8%	51%	2	5%
<b>6</b>	<b>26</b>	<b>3</b>	<b>3.2</b>	<b>150</b>	<b>51%</b>	<b>12%</b>	<b>37%</b>	<b>1</b>	<b>4%</b>
7	24	4	3	44	72%	12%	16%	5	3%
8	21	3	3	33	40%	12%	48%	2	4%
<b>9</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>101</b>	<b>38%</b>	<b>13%</b>	<b>49%</b>	<b>0</b>	<b>6%</b>
<b>10</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>1.6</b>	<b>63</b>	<b>37%</b>	<b>13%</b>	<b>50%</b>	<b>0</b>	<b>4%</b>
<b>11</b>	<b>26</b>	<b>3</b>	<b>1.8</b>	<b>179</b>	<b>50%</b>	<b>9%</b>	<b>41%</b>	<b>0</b>	<b>4%</b>
12	24	4	5.4	11	27%	9%	64%	1	2%
13	23	5	1.8	17	41%	12%	47%	2	2%
14	25	3	0.2	49	0%	4%	96%	0	4%
15	22	3	2.6	44	25%	12%	63%	1	4%
16	21	4	4.3	30	23%	47%	30%	2	3%
17	19	3	2.4	76	36%	15%	49%	5	2%
18	25	3	3.2	23	40%	4%	56%	5	1%
<b>19</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>1.5</b>	<b>94</b>	<b>36%</b>	<b>27%</b>	<b>37%</b>	<b>1</b>	<b>5%</b>
<b>20</b>	<b>24</b>	<b>5</b>	<b>3.1</b>	<b>66</b>	<b>36%</b>	<b>3%</b>	<b>61%</b>	<b>1</b>	<b>5%</b>
<b>21</b>	<b>24</b>	<b>5</b>	<b>1.9</b>	<b>93</b>	<b>33%</b>	<b>21%</b>	<b>46%</b>	<b>0</b>	<b>4%</b>
22	26	4	1	20	20%	5%	75%	4	4%
23	23	4	3	50	65%	10%	25%	0	2%
<b>24</b>	<b>24</b>	<b>3</b>	<b>2.8</b>	<b>63</b>	<b>68%</b>	<b>5%</b>	<b>27%</b>	<b>1</b>	<b>6%</b>
25	23	3	2.7	17	35%	10%	55%	1	4%
26	22	3	4.2	20	15%	5%	80%	1	4%
27	24	3	2.8	6	38%	3%	59%	0	4%
28	25	3	3.2	15	26%	13%	61%	0	1%
<b>29</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>5.3</b>	<b>147</b>	<b>78%</b>	<b>7%</b>	<b>15%</b>	<b>1</b>	<b>7%</b>
<b>30</b>	<b>25</b>	<b>3</b>	<b>2.9</b>	<b>94</b>	<b>33%</b>	<b>18%</b>	<b>49%</b>	<b>0</b>	<b>5%</b>
<b>31</b>	<b>24</b>	<b>3</b>	<b>2.8</b>	<b>107</b>	<b>66%</b>	<b>6%</b>	<b>28%</b>	<b>1</b>	<b>4%</b>
32	26	5	1.4	73	68%	8%	24%	1	8%
33	24	3	4.9	29	34%	7%	59%	3	3%
34	27	4	2.9	37	30%	25%	45%	1	6%
<b>35</b>	<b>27</b>	<b>4</b>	<b>5.9</b>	<b>136</b>	<b>51%</b>	<b>29%</b>	<b>20%</b>	<b>1</b>	<b>12%</b>

Tabla N° 2

Resumen de los datos descriptivos de la población muestreada

Variable	N	Media± DS
Edad(años)	35	23,9±2,0
Abs(días)	35	3,5±0,7
Vol(ml)	35	2,9±1,39
C (Spz*10 <sup>6</sup> xml)	35	67±47,41
mot prog (%)	35	40,5±17,59
mot insitu(%)	35	12,3±8,9
mot inmo(%)	35	47,1±19,01
Leucocitos10 <sup>6</sup> xm	35	1,28±1,4
Morfología(%)	35	4,3±2,08

Tabla N° 3

Valores descriptivos de la población seleccionada pre y post capacitación

Variable	N	Media± DS
Motilidad Pre capacitación (%)	15	48,5±13,73
Motilidad Post capacitación (%)	15	96,3±1,23

T de Student (\*\*) $p < 0.01$

Tabla N° 4

Valores descriptivos resumidos del coeficiente de daño detectado por cada tinción

Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tinción	Coeficiente de Daño± DS
0 mM	SybrGreen	19,3±1,7
10 mM	SybrGreen	34,1±2
30 mM	SybrGreen	161,1±4,3
60 mM	SybrGreen	272,3±6,4
100 mM	SybrGreen	365,6±3,9
0 mM	Giemsa	8,7±0,877
10 mM	Giemsa	19,2±5,02
30 mM	Giemsa	138,5±9,41
60 mM	Giemsa	259,6±9,34
100 mM	Giemsa	329±5,39
0 mM	Diffquik	6,2±0,58
10 mM	Diffquik	5,6±0,9
30 mM	Diffquik	102,8±2,8
60 mM	Diffquik	222,8±5,1
100 mM	Diffquik	239,611±6,8

Tabla N° 5

Valores de la pendiente y ajuste de recta de la regresión lineal para el coeficiente de daño

Tinción	Pendiente	R
SybrGreen	3,67	0,96
Giemsa	3,45	0,95
Diffquik	2,57	0,90

Tabla N° 6

Interacciones sobre el Coeficiente de daño detectado por el modelo lineal univariado

Interacción	Coeficiente de Daño detectado	Valor P
Tinción*Concentración	Sybr-Diffquik-Giemsa	<0.01
	Sybr-Diffquik	<0.01
	Sybr-Giemsa	<0.05 (0.036)
	Giemsa-Diffquik	<0.01
Tinción*Sujeto	Sybr-Diffquik	0.630
	Giemsa-Diffquik	0.221
	Sybr-Giemsa	0.163
	Sybr-Diffquik-Giemsa	0.100

Tabla N° 7

Valores descriptivos del porcentaje de ADN en la cola detectado por cada tinción

Porcentaje de ADN en la cola	Tinción	Porcentaje de ADN en la cola $\pm$ DS
0 mM	SybrGreen	1,9 $\pm$ 0,1
10 mM	SybrGreen	12,3 $\pm$ 0,2
30 mM	SybrGreen	22,5 $\pm$ 0,3
60 mM	SybrGreen	66,2 $\pm$ 0,91
100 mM	SybrGreen	80,6 $\pm$ 0,95
0 mM	Giemsa	1,5 $\pm$ 0,3
10 mM	Giemsa	8,4 $\pm$ 0,9
30 mM	Giemsa	23,1 $\pm$ 0,6
60 mM	Giemsa	64,9 $\pm$ 0,6
100 mM	Giemsa	74,3 $\pm$ 0,8
0 mM	Diffquik	1,41 $\pm$ 0,1
10 mM	Diffquik	4,2 $\pm$ 0,41
30 mM	Diffquik	14,8 $\pm$ 0,9
60 mM	Diffquik	63,3 $\pm$ 0,5
100 mM	Diffquik	70,83 $\pm$ 1,8

Tabla N° 8

Valores de la pendiente y ajuste de recta de la regresión lineal para el porcentaje de ADN en la cola

Tinción	Pendiente	R
SybrGreen	0,83	0,95
Giemsa	0,79	0,93
Diffquik	0,77	0,89

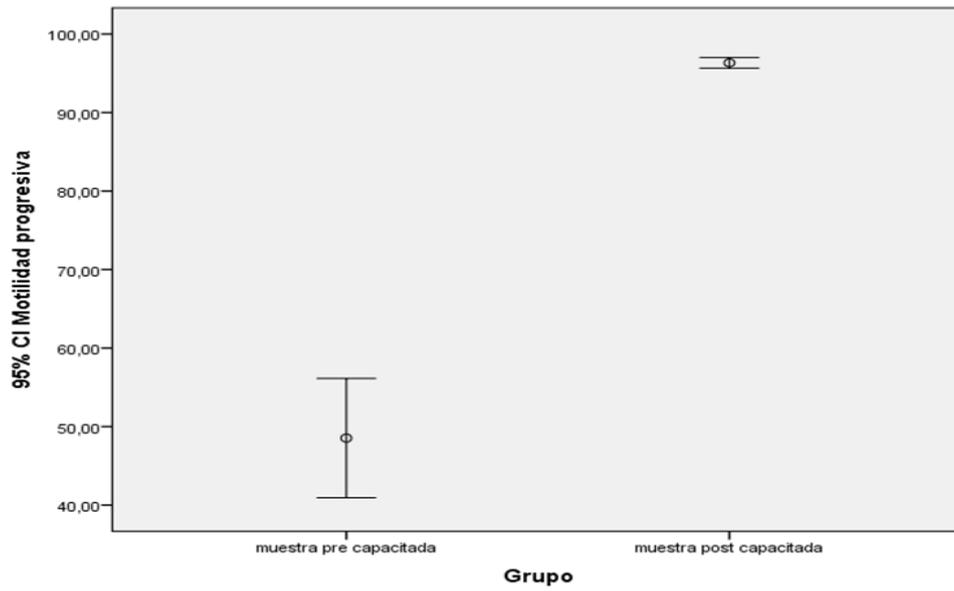
Tabla N° 9

Interacciones sobre el porcentaje de ADN en la cola por el modelo lineal univariado

Interacción	Porcentaje de ADN en la cola	Valor P
Tinción*Concentración	Sybr-Diffquik-Giemsa	<0.01
	Sybr-Diffquik	<0.01
	Sybr-Giemsa	<0.01
	Giemsa-Diffquik	<0.01
Tinción*Sujeto	Sybr-Diffquik-Giemsa	0.478
	Giemsa-Diffquik	0.580
	Sybr-Giemsa	0.290
	Sybr-Diffquik	0.076

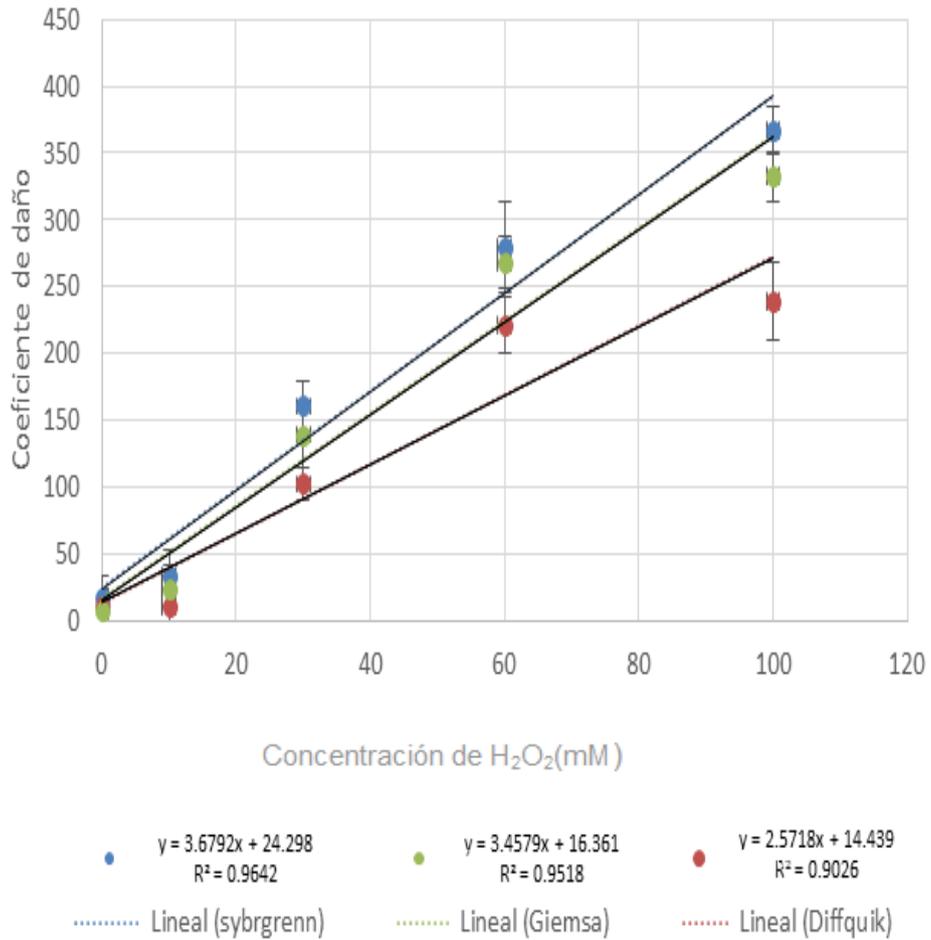
**Figura 2**

Figura en cajas de los estadísticos descriptivos del porcentaje de motilidad progresiva de las muestras pre capacitadas y post capacitadas



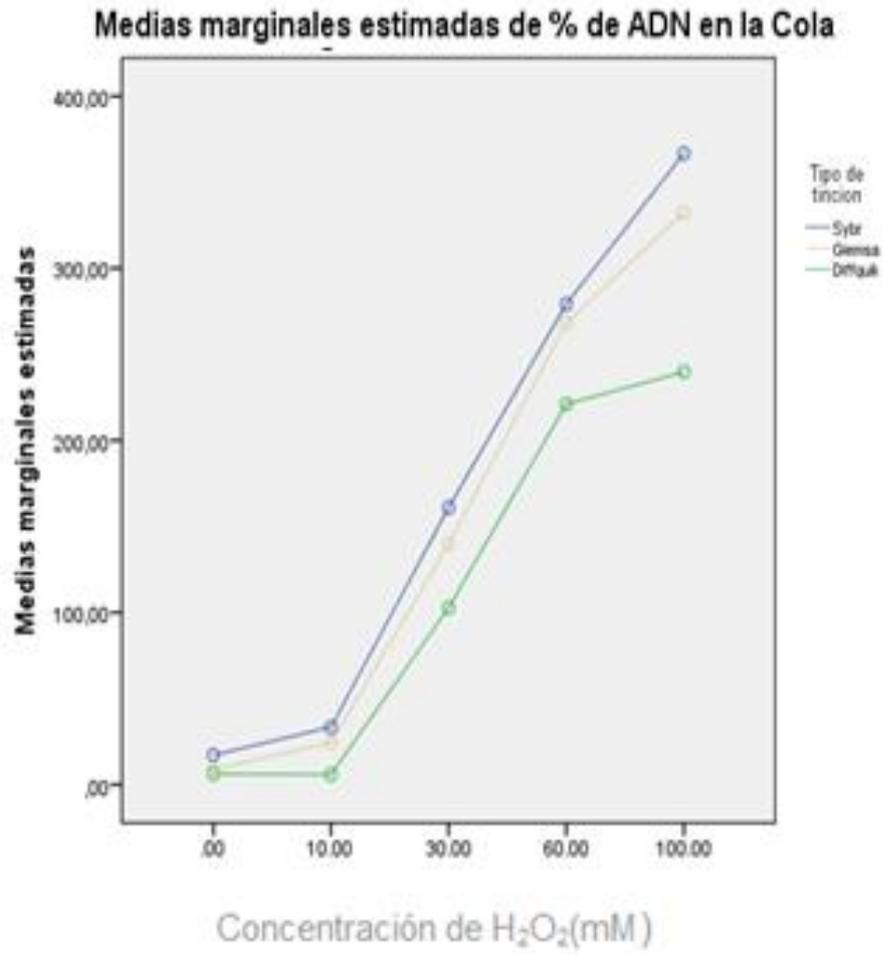
**Figura 3**

Comparación de pendientes de las regresiones lineales de SybrGreen, Diffquik y Giemsa del coeficiente de daño y las concentraciones de Peróxido de Hidrogeno en el coeficiente de daño



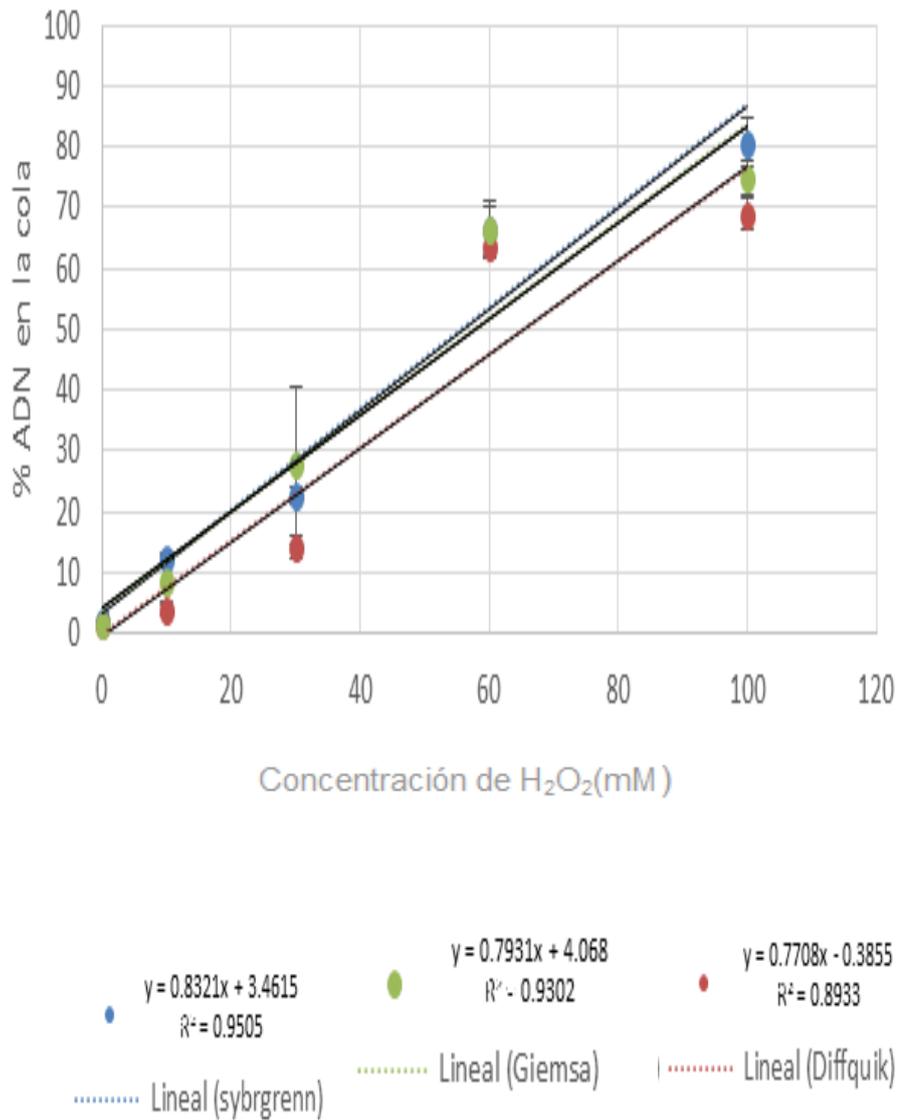
**Figura 4**

Figura de medias marginales de tinciones VS concentraciones de Peróxido de Hidrogeno



**Figura 5**

Comparación de pendientes de las regresiones lineales de SybrGreen, Giemsa y Diffquik del coeficiente de daño y las concentraciones de Peróxido de Hidrogeno en el porcentaje de ADN en la cola



**Figura 6**

Medias marginales de porcentaje de ADN en la cola de las tinciones SybrGreen, Giemsa y Diffquik en las diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrogeno

**Medias marginales estimadas de % de ADN en la Cola**

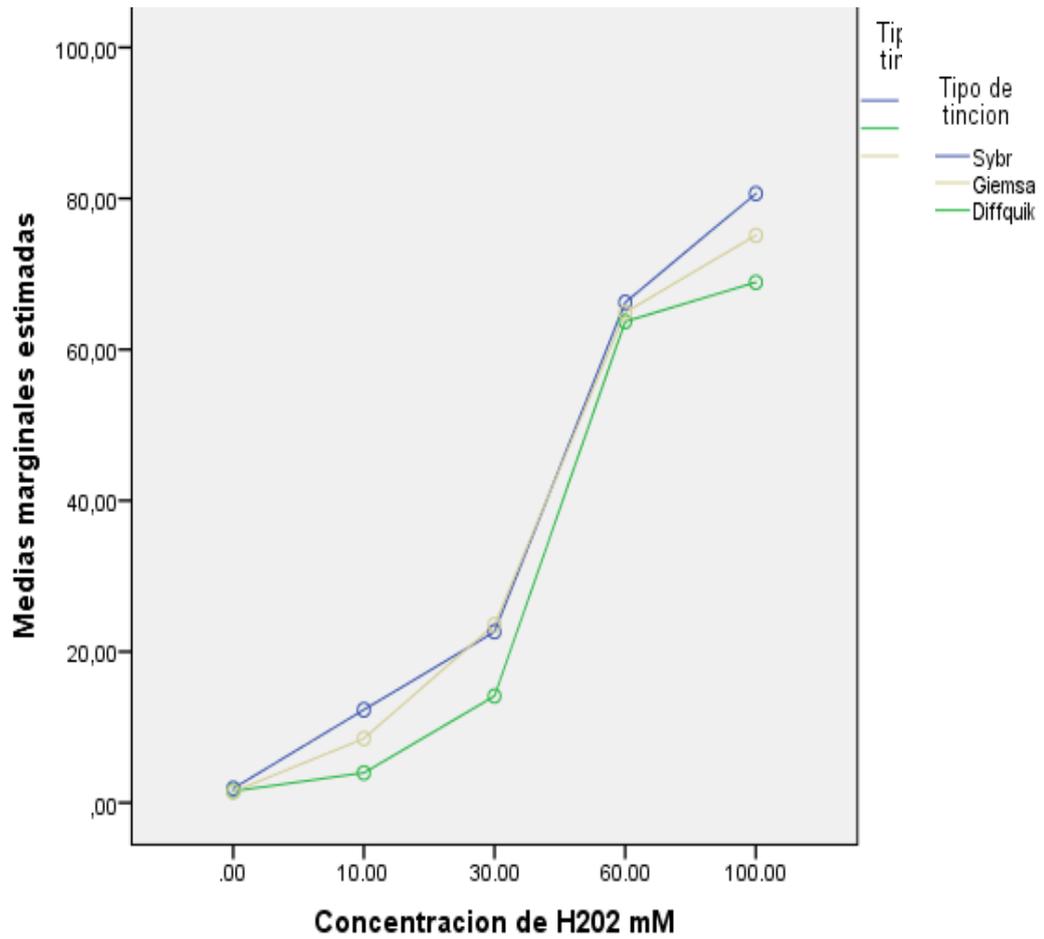
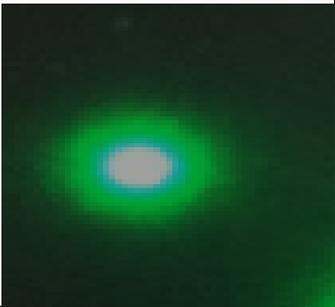
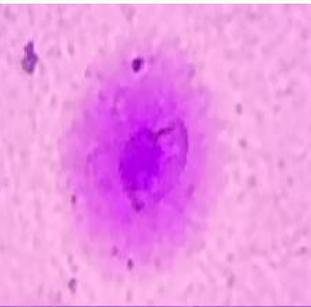
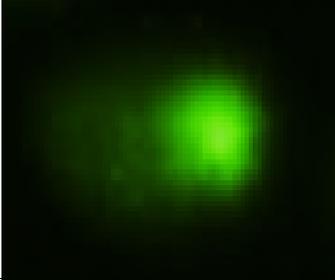
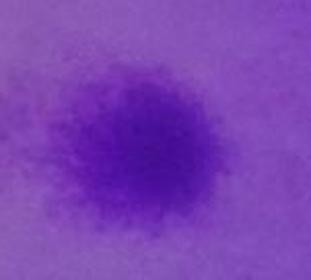
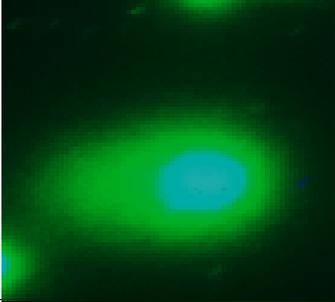
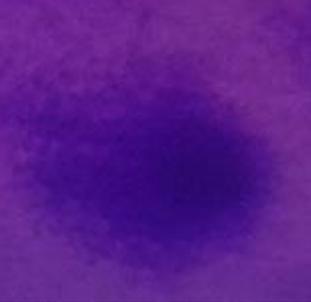
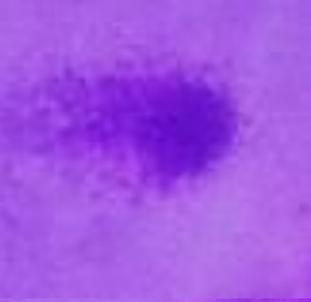
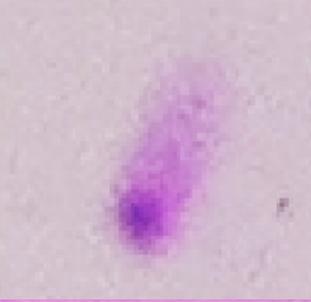
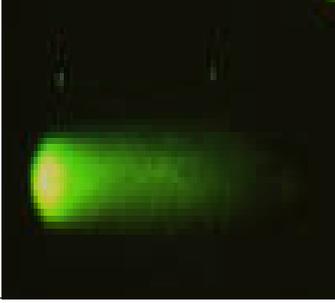
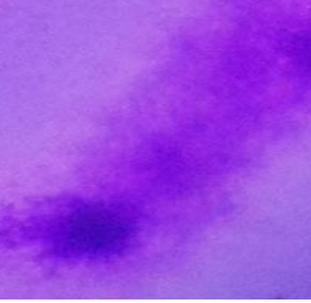
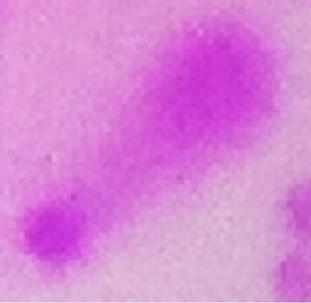


Figura 1

Patrones de migración de ADN en el bioensayo cometa observado a 400X

	SybrGreen	Giemsa	Diffquik
0 mm			
10 mm			
30 mm			
60 mm			
100 mm			



**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

**LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA ANIMAL**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Tesis:** EVALUACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD DE TINCIONES NO FLUORESCENTES DE DIFFQUIK, GIEMSA, FASTBLAST Y DE FEULGEN CON EL BIOENSAYO COMETA EN EL ADN ESPERMÁTICO HUMANO.

Yo, ....., identificado con número de DNI ....., acepto participar voluntariamente en esta investigación. La información que proporcione será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. Mis respuestas al cuestionario y a la entrevista serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona. Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando éste haya concluido.

Santiago de Surco, de del 2015

---

Firma del investigador principal

---

Firma participante