



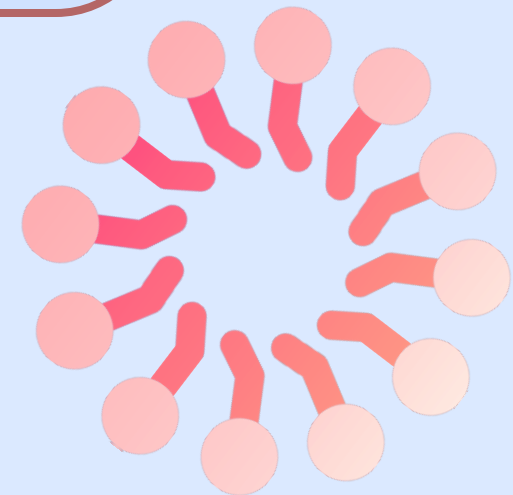
**Workshop de Investigación Facultad de Farmacia**  
"La Investigación nuestro mejor medicamento"  
25 de noviembre de 2024

# Nanotecnología y reproducción



Manuel Alfaro Gómez

**Grupo SaBio-IREC**

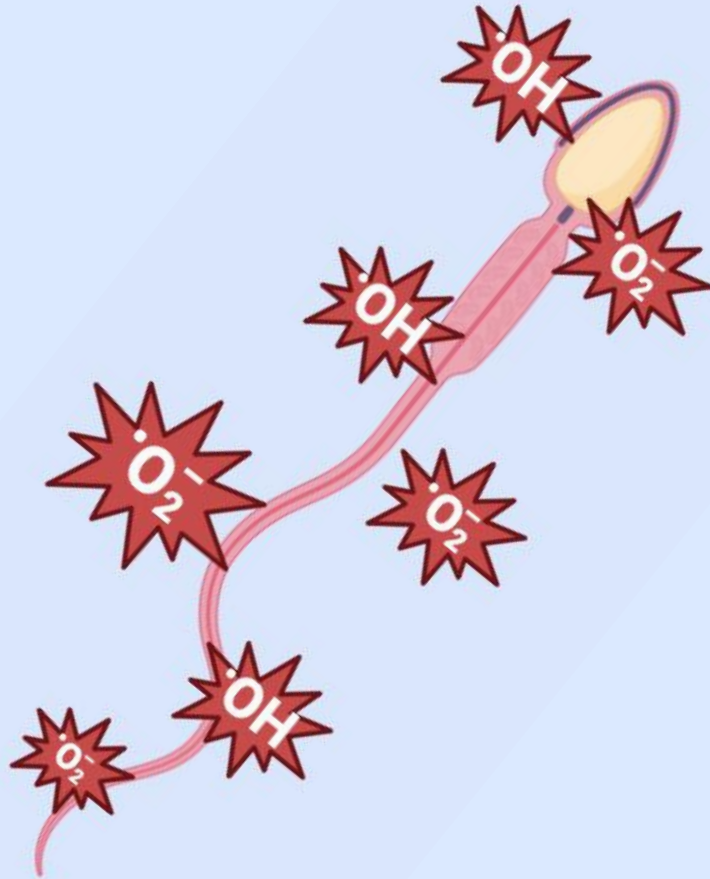


**OS is considered the underlying cause of 30–80% of male infertility cases**

**El estrés oxidativo se considera la causa subyacente en el 30–80% de los casos de infertilidad masculina**



Hamada et al., 2012  
Dutta et al., 2022



01

# INTRODUCCIÓN

Fisiología espermática y estrés oxidativo

## Radicales libres



Especies químicas altamente reactivas ya que presentan uno o más electrones desapareados. Capaces de “robar” los electrones de otros compuestos y/o componentes celulares, provocando modificaciones.

## Radicales libres



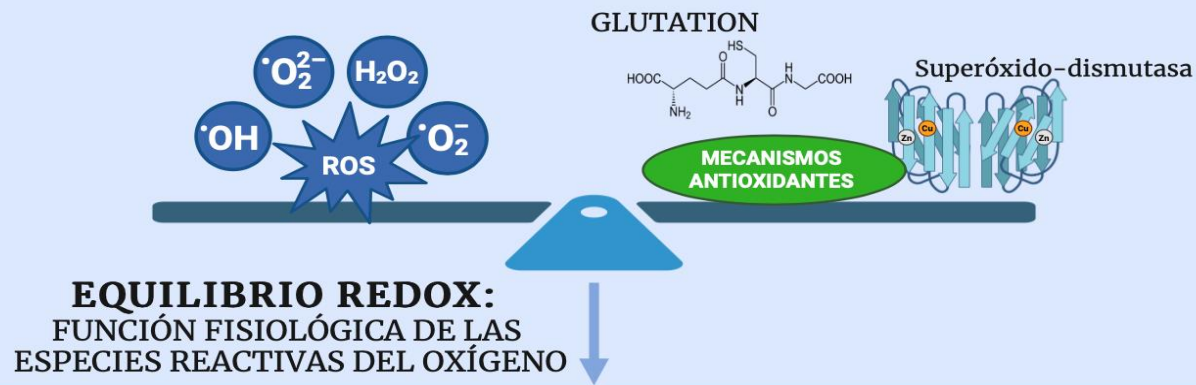
Especies químicas altamente reactivas ya que presentan uno o más electrones desapareados. Capaces de “robar” los electrones de otros compuestos y/o componentes celulares, provocando modificaciones.

# ¿SON SIEMPRE PERJUDICIALES?

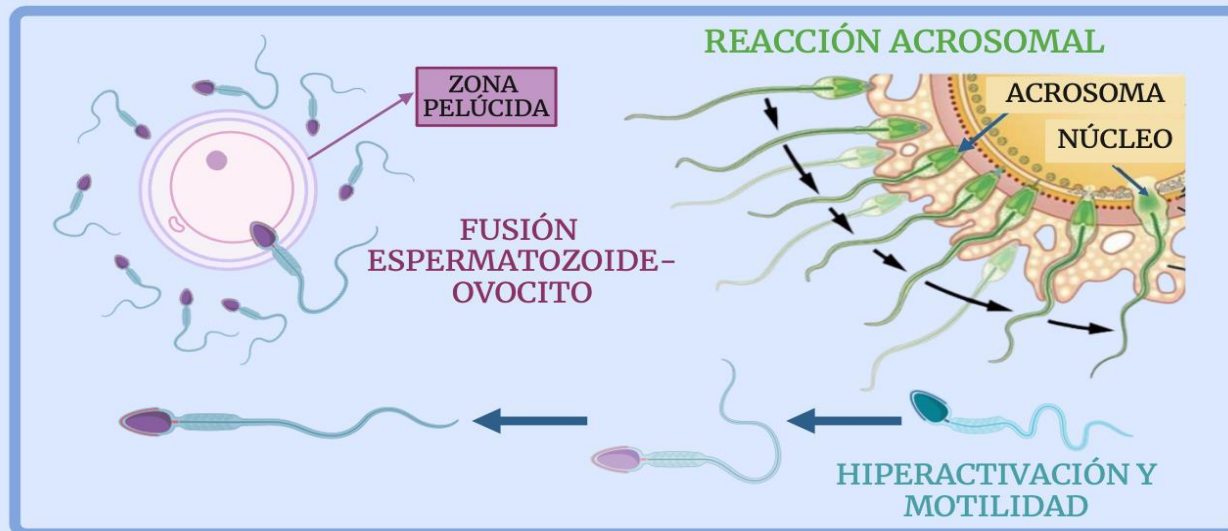
# ¿SON SIEMPRE PERJUDICIALES?



# LA CLAVE ES EL EQUILIBRIO



# FUNCIÓN FISIOLÓGICA



# FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS RADICALES

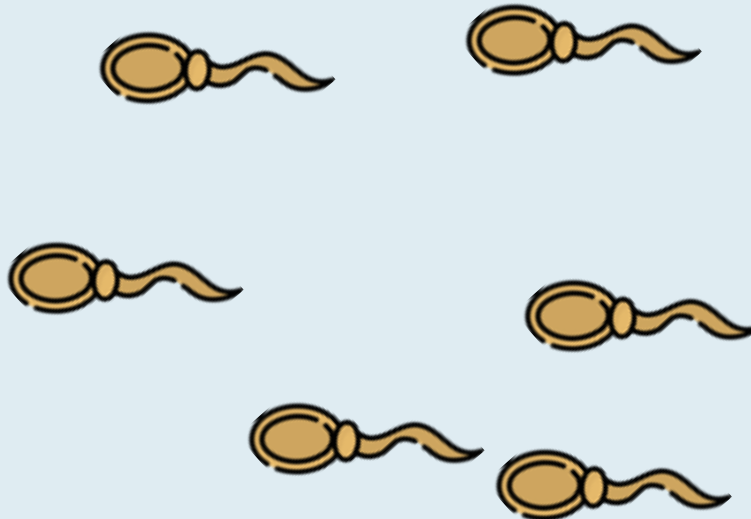
## Oviducto

Reacción  
acrosómica



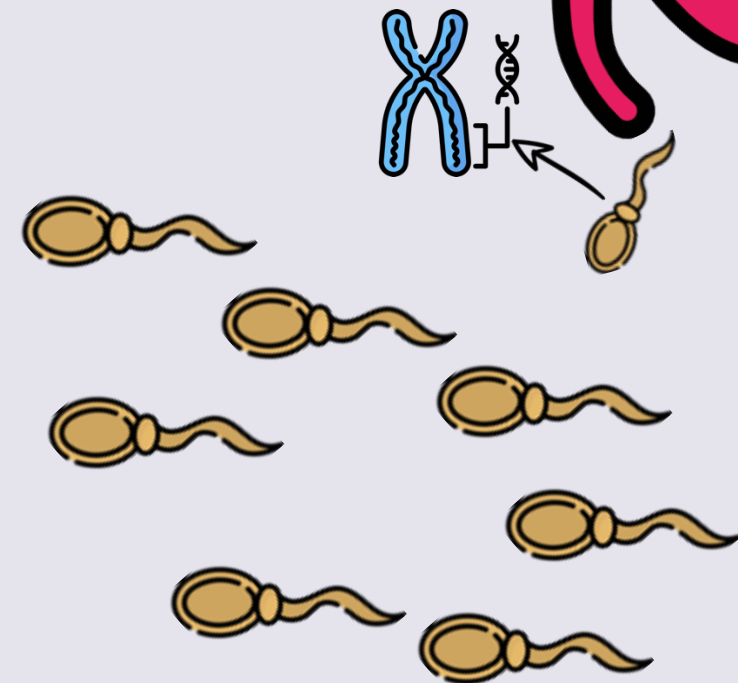
## Vagina/Útero

Capacitación  
Hiperactivación



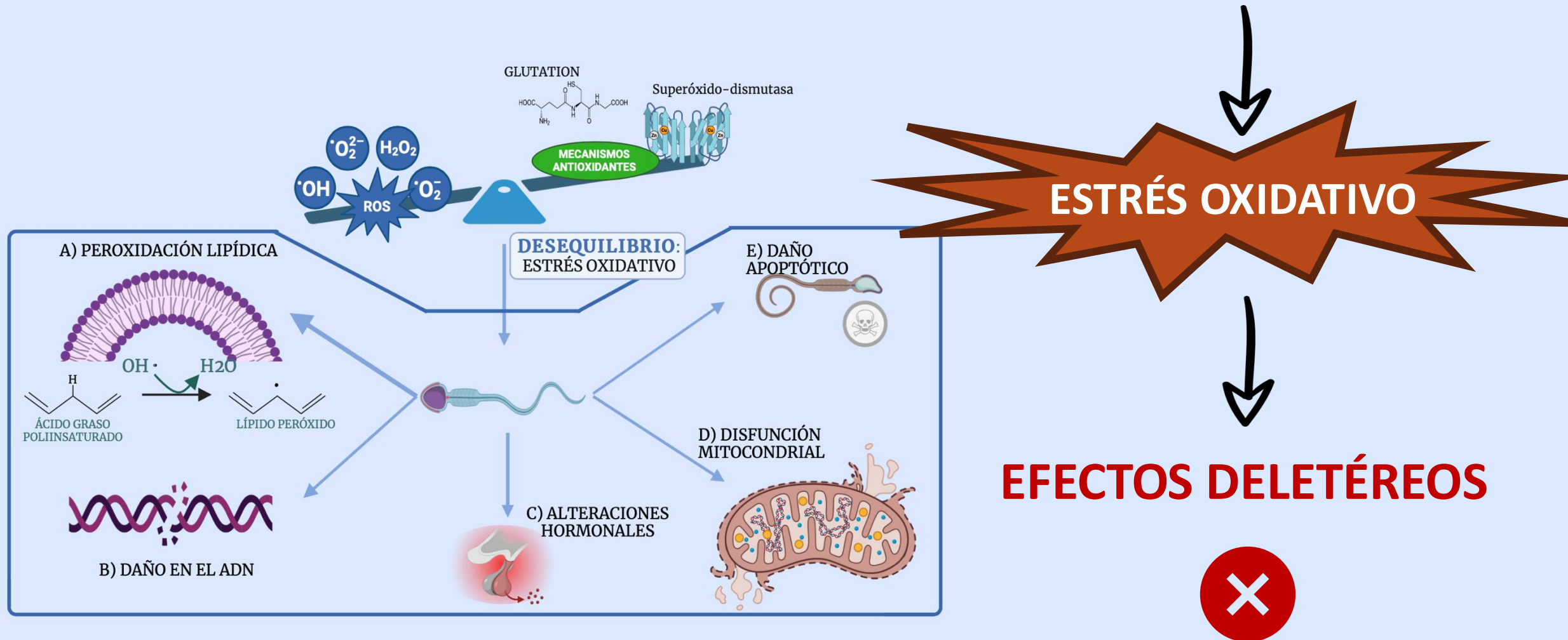
## Eyaculación

Compactación de  
la cromatina



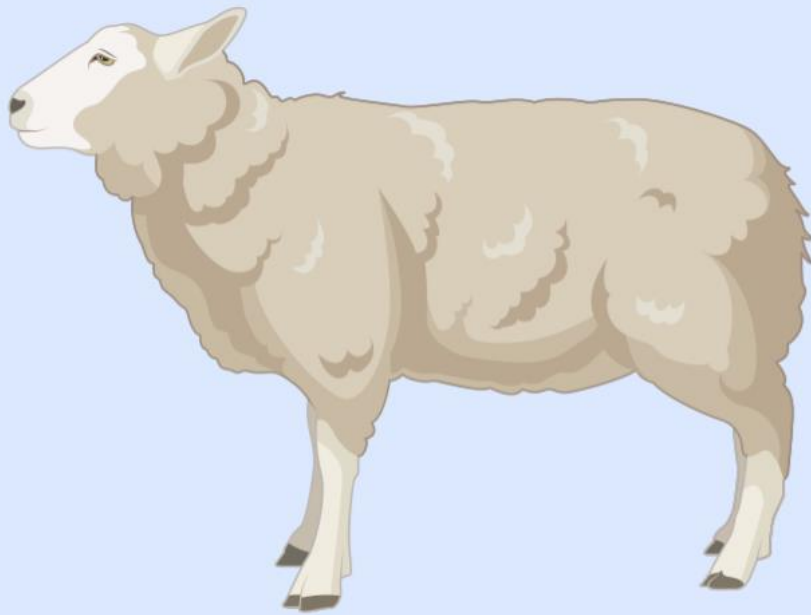
Epidídimo

# SI LOS RADICALES LIBRES SOBREPASAN A LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES





02

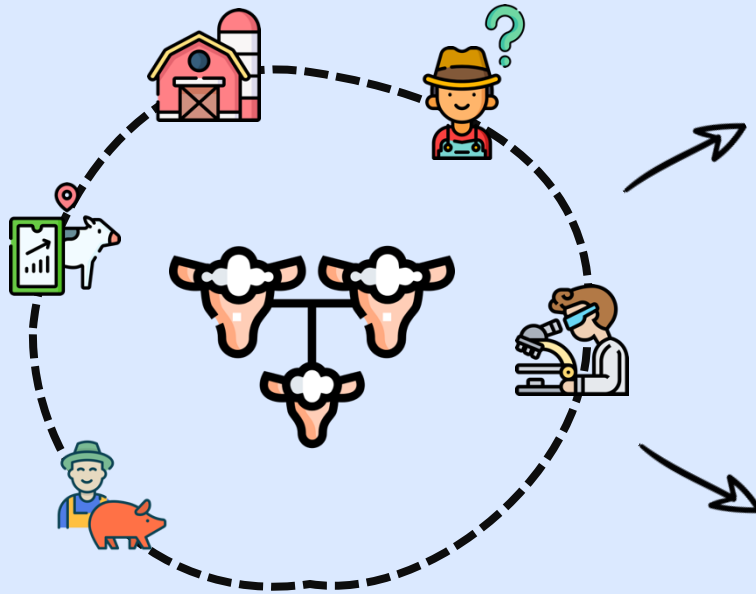


# LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN RAZA OVINA

Programas de cría y de mejora genética



# RAZA OVINA MANCHEGA (*Ovis aries*)



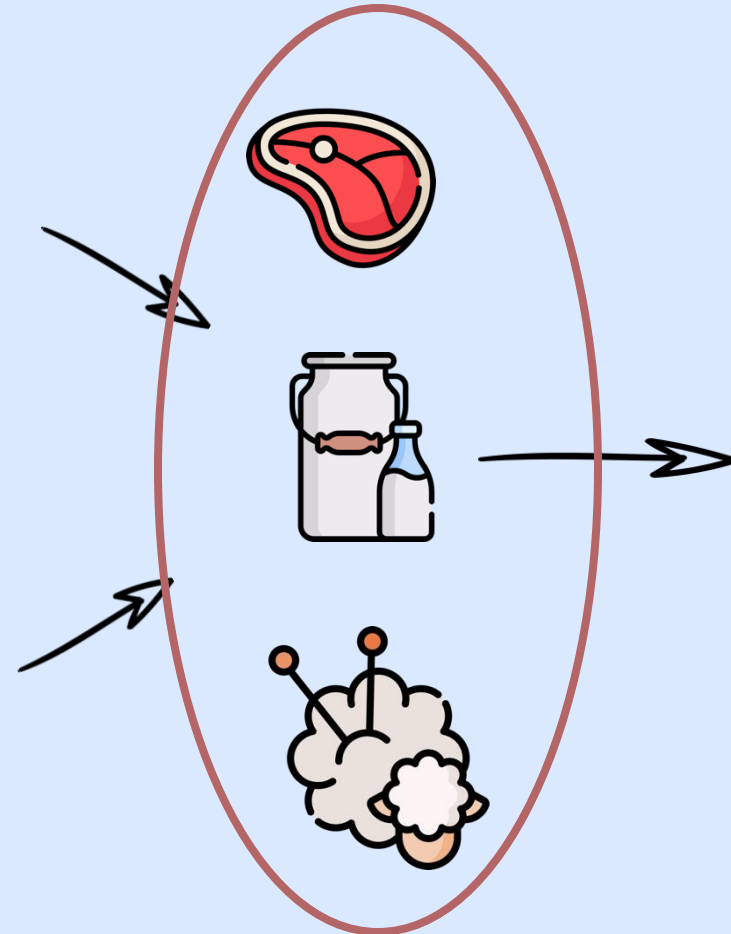
**Programas de cría y mejora genética**



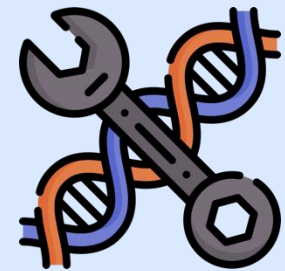
**Desarrollo**



**Mejora**



**Reproductiva**



**Genética**

# Criopreservación y bancos de germoplasma

Conservación de:

- **Espermatozoides**
- Ovocitos
- Embriones

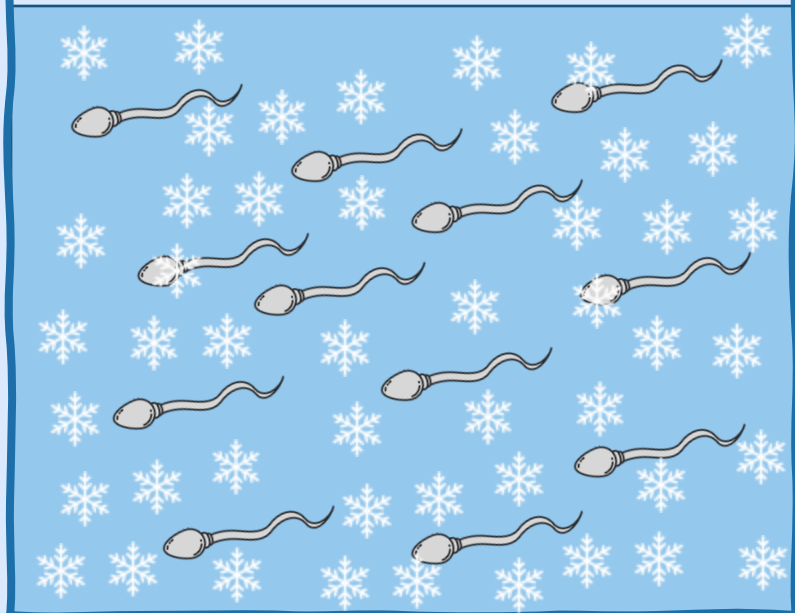
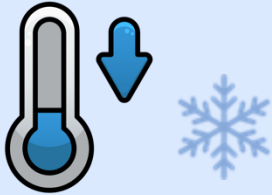


**EFFECTOS NEGATIVOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LOS ESPERMATOZOIDEOS**

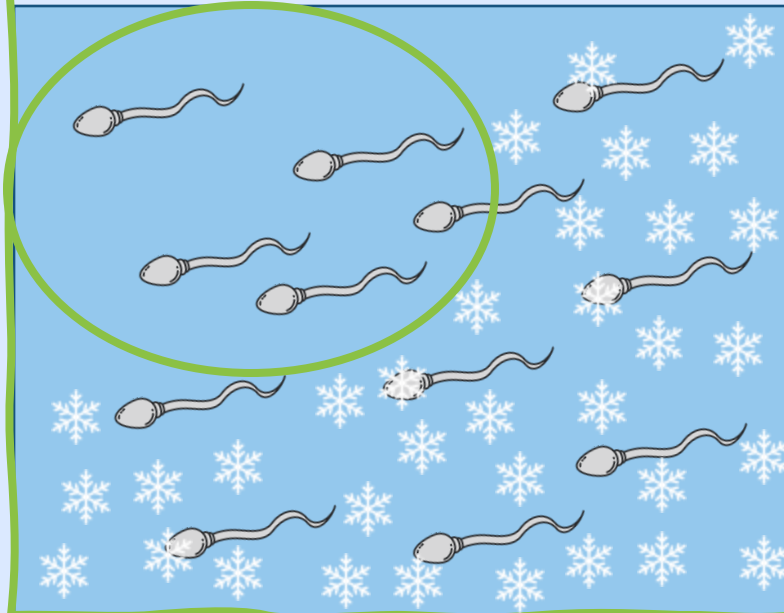
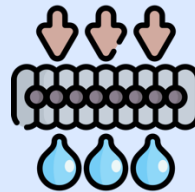
N<sub>2</sub> LÍQUIDO A -196 °C

# Consecuencias de la criopreservación

## Formación de cristales



## Estrés osmótico



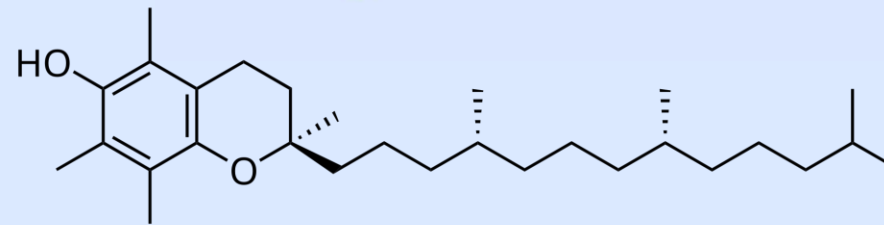
## ESTRÉS OXIDATIVO

- Alteración de proteínas
- Ubiquitinación
- **Peroxidación lipídica**
- **Daño en el ADN**



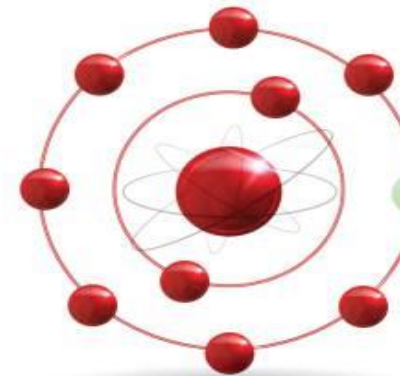
## ESTRÉS OXIDATIVO

- Alteración de proteínas
- Ubiquitinación
- **Peroxidación lipídica**
- **Daño en el ADN**

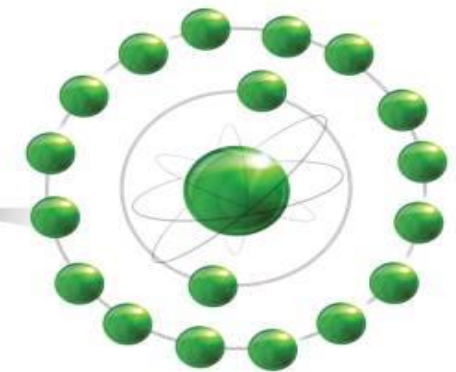


### Vitamina E

Zinc  
Selenio  
Coenzima Q10  
Betacaroteno  
Vitamina C



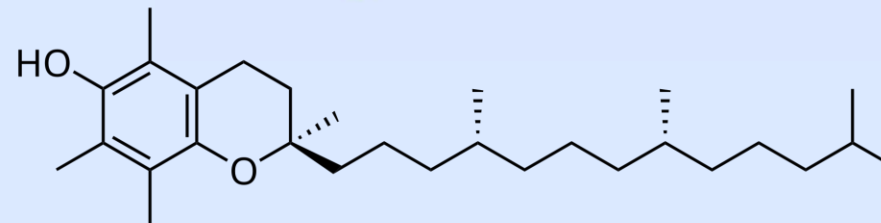
FREE RADICAL WITH  
MISSING ELECTRON



ANTIOXIDANT  
DONATES ELECTRON

## ESTRÉS OXIDATIVO

- Alteración de proteínas
- Ubiquitinación
- **Peroxidación lipídica**
- **Daño en el ADN**



### Vitamina E

Zinc  
Selenio  
Coenzima Q10  
Betacaroteno  
Vitamina C

## PROBLEMAS PARA SU FORMULACIÓN



FORMULACIONES CON **VITAMINA E**:  
TOXICIDAD DE ALGUNOS DE SUS  
COMPONENTES (Etanol, DMSO)



## ESTRÉS OXIDATIVO

- Alteración de proteínas
- Ubiquitinación
- **Peroxidación lipídica**
- **Daño en el ADN**

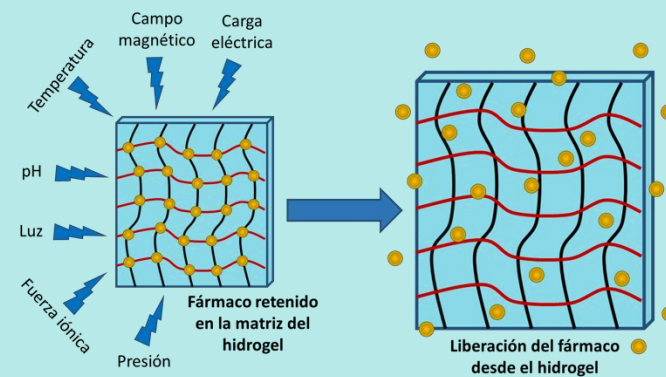


## PROBLEMAS PARA SU FORMULACIÓN



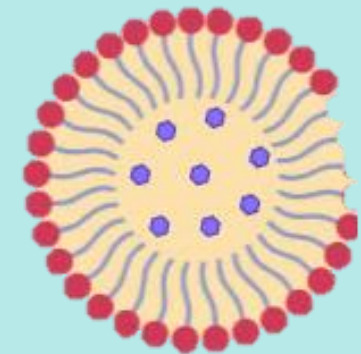
FORMULACIONES CON **VITAMINA E**:  
TOXICIDAD DE ALGUNOS DE SUS  
COMPONENTES (Etanol, DMSO)

## INCORPORACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA DRUG DELIVERY SYSTEMS (DDS)



Hidrogeles

Nanoemulsiones

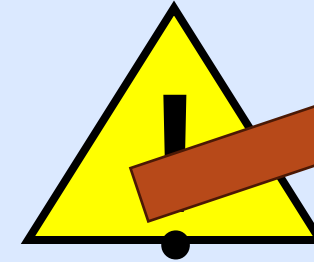


## ESTRÉS OXIDATIVO

- Alteración de proteínas
- Ubiquitinación
- **Peroxidación lipídica**
- **Daño en el ADN**

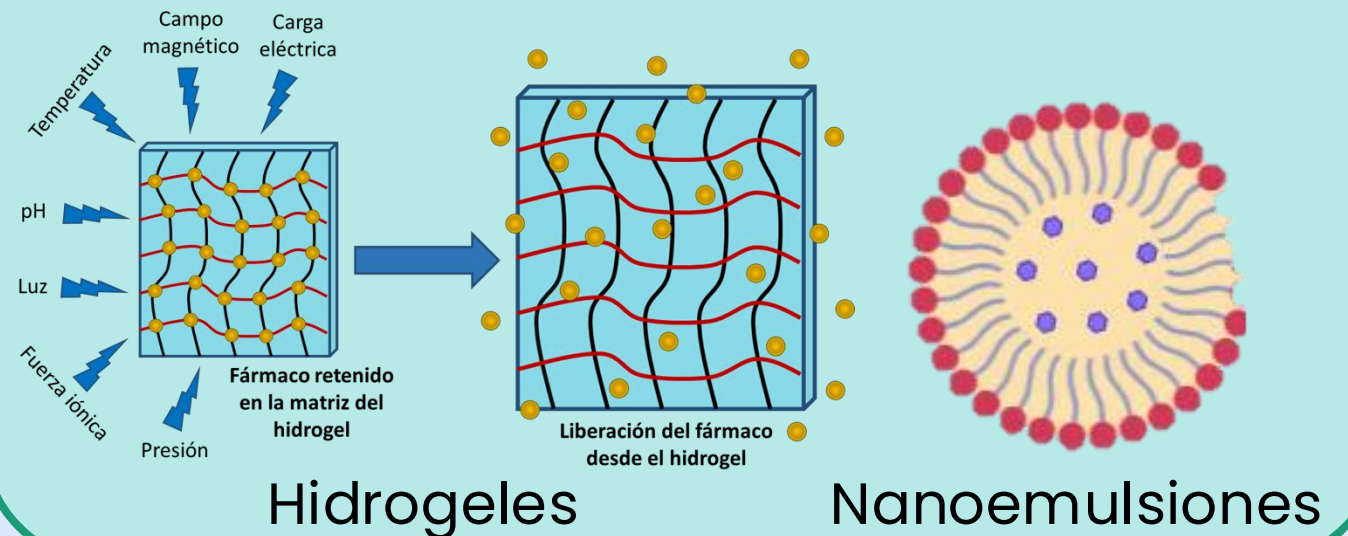


## PROBLEMAS PARA SU FORMULACIÓN

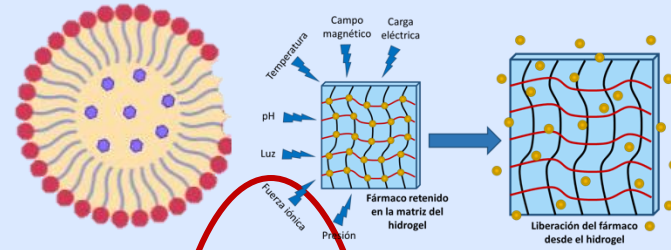
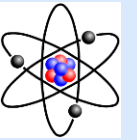
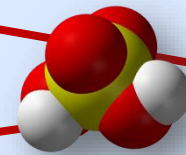
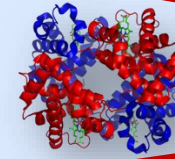
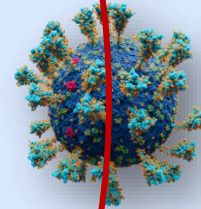
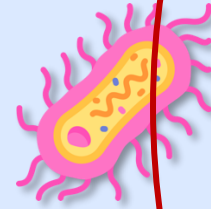
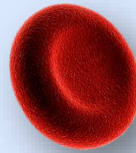


TOXICIDAD DE ALGUNOS  
DE SUS COMPONENTES  
(Etanol, DMSO)

## INCORPORACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA DRUG DELIVERY SYSTEMS (DDS)







1 m

10 cm

10  $\mu$ m

1000 nm

100 nm

10 nm

1 nm

0.1 nm

Niño

Petauro

Glóbulo rojo

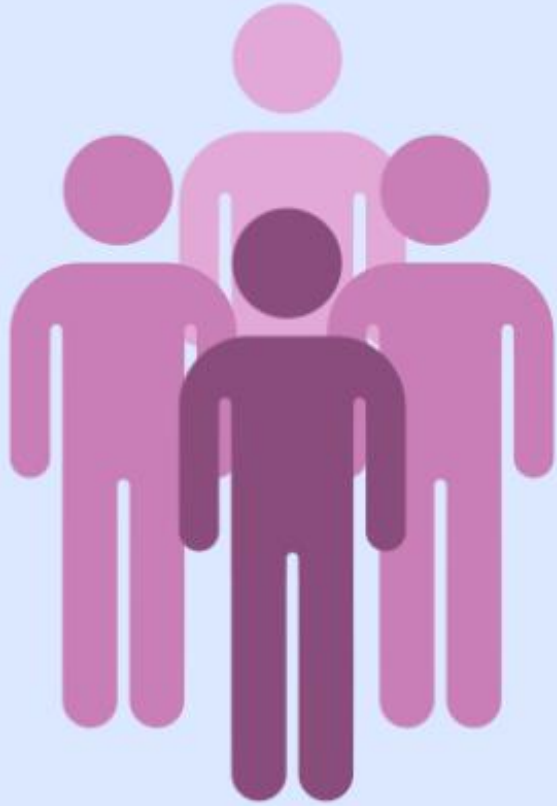
Bacteria

Virus

Hemoglobina

Molécula de azúcar

Átomo

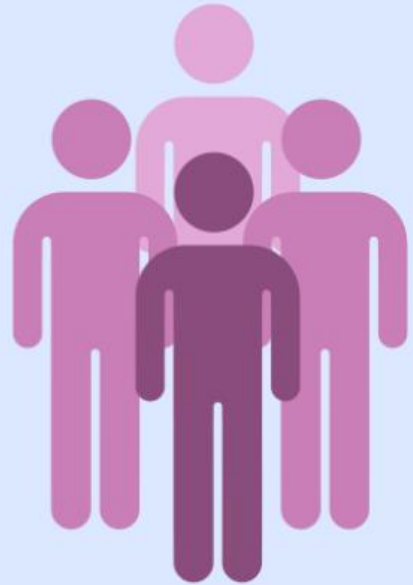


03

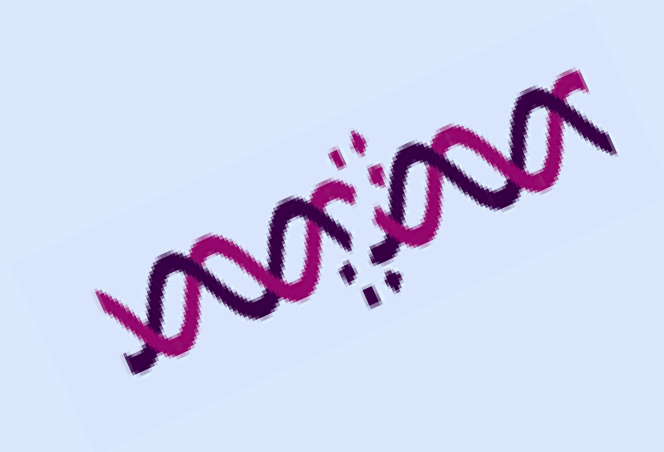
# LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN EN HUMANO

Determinación de biomarcadores en plasma seminal

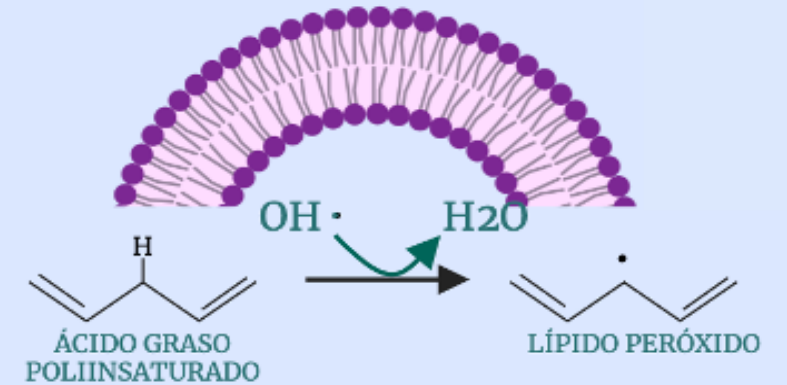
# HUMANOS



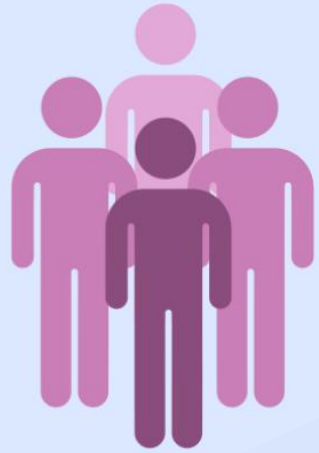
Se estima que el **estrés oxidativo** se encuentra presente a niveles elevados en el **80% de los hombres infértiles**



**DAÑO EN EL ADN**



**DAÑO EN LA MEMBRANA**  
(peroxidación lipídica)

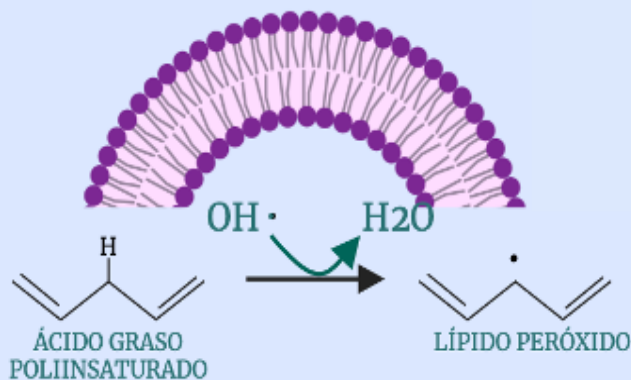


Se estima que el **estrés oxidativo** se encuentra presente a niveles elevados en el **80% de los hombres infértiles**



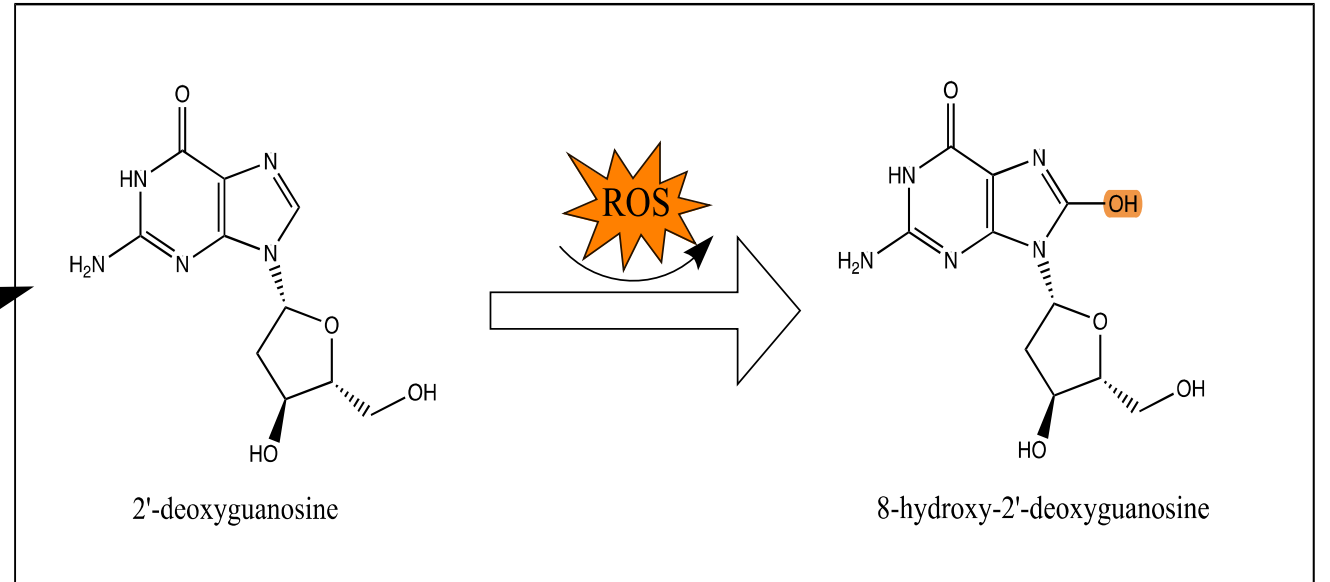
**Expulsión** de  
productos de  
degradación  
(**plasma seminal**)

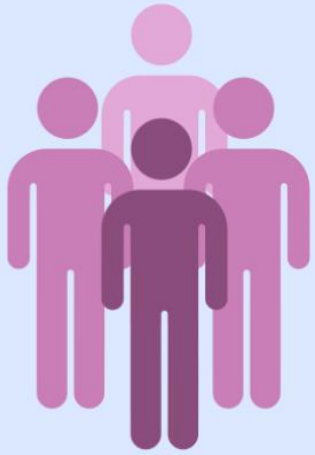
Productos detectables  
**BIOMARCADORES**  
de daño por estrés oxidativo





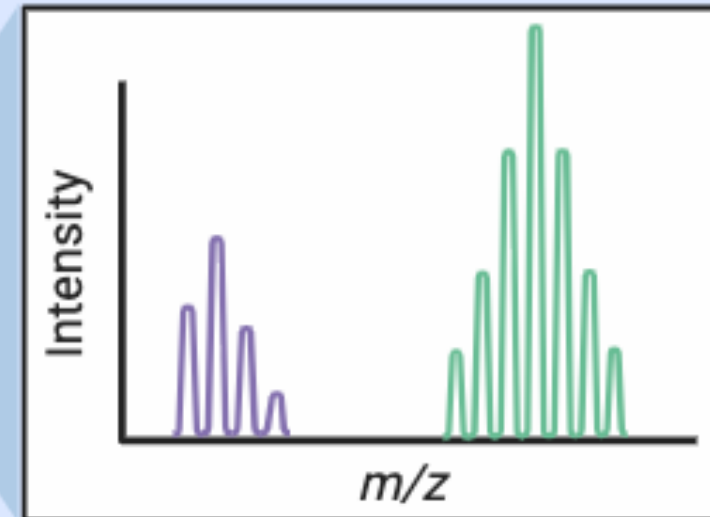
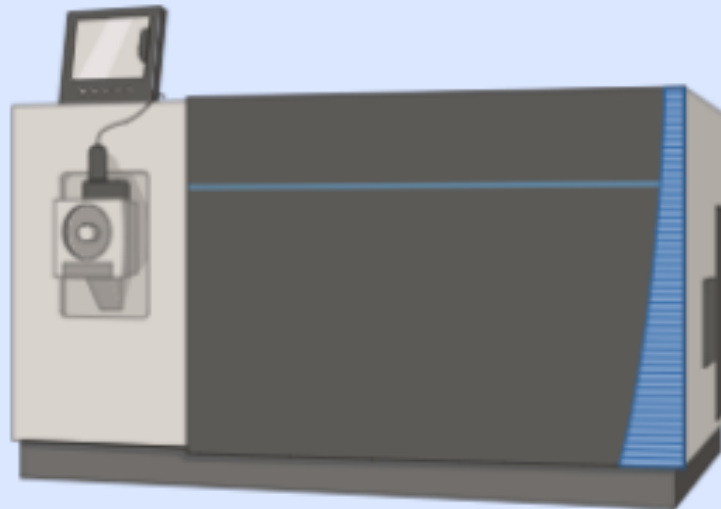
**DAÑO EN EL ADN**





## DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE LC-MS/MS

- Análisis simultáneo de varios compuestos
- Poder de separación de HPLC
- Poder de detección de MS
- Determinación sensible y selectiva → ng/mL



Sistema CASA Sperm Class Analyzer®

SCA

mot mrf dna vit acr leu

04

# MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención, tratamiento y evaluación de muestras





## Obtención de muestras (ovino)



Granja de  
experimentación  
animal de la **UCLM**

Recolección de  
muestras mediante  
vagina artificial





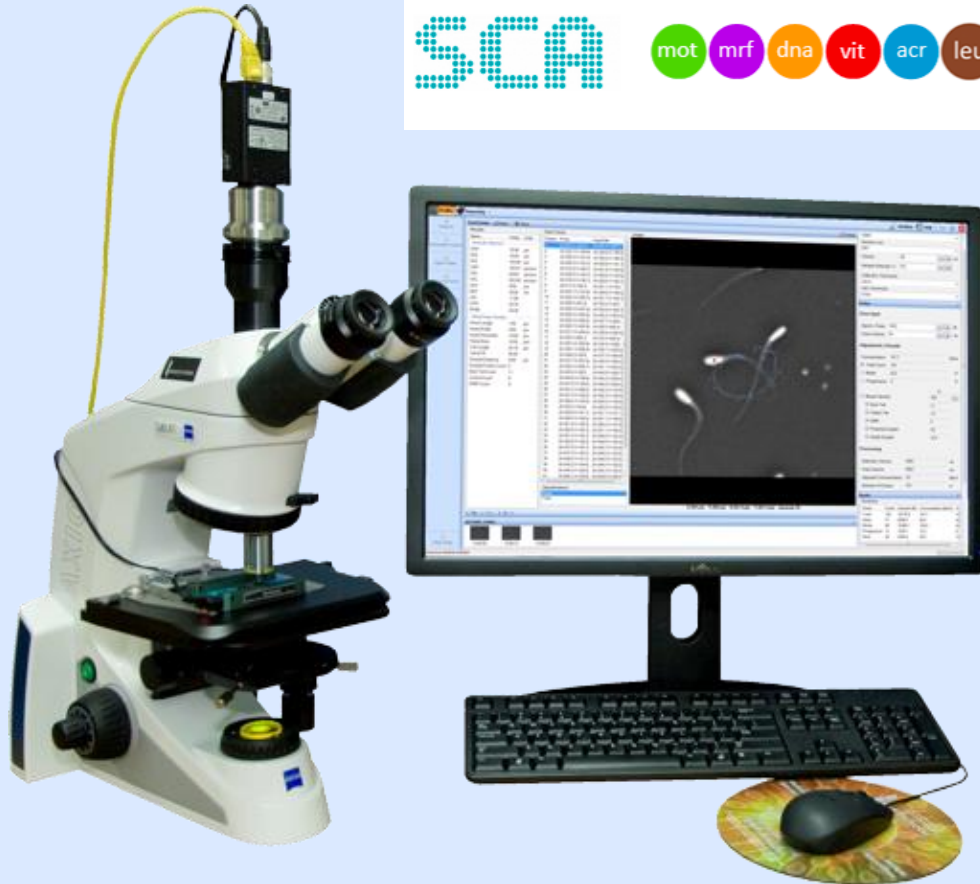
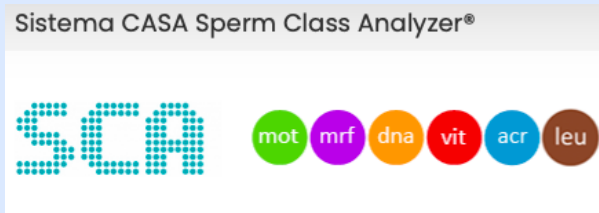
## Obtención de muestras (ovino)



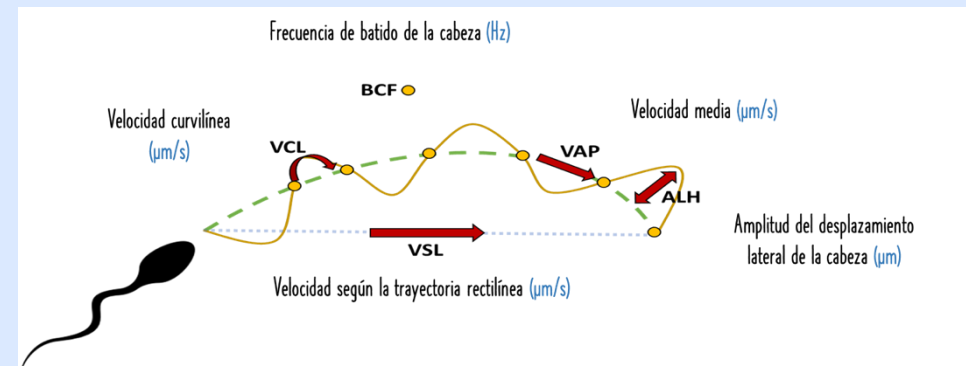
## Obtención de muestras de humano



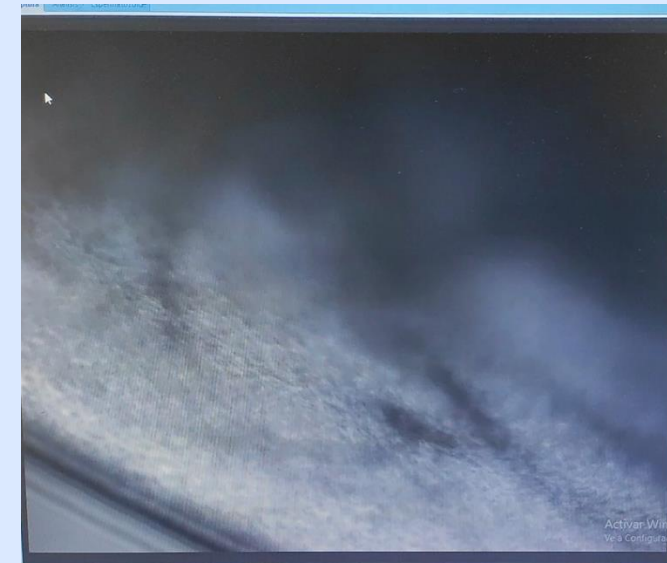
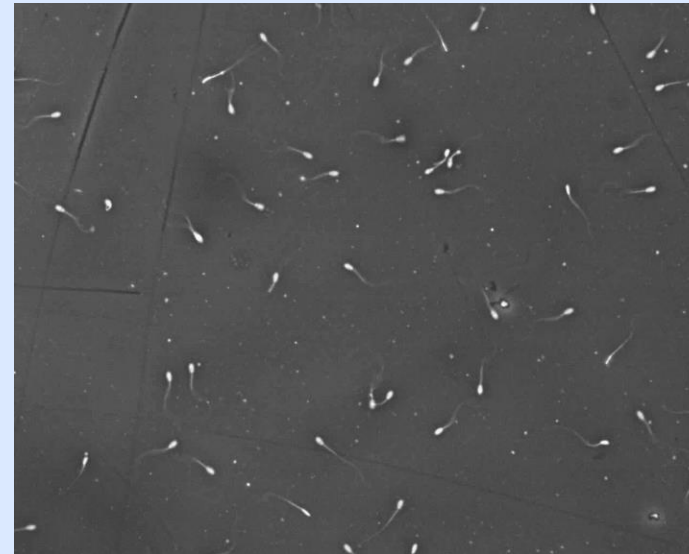
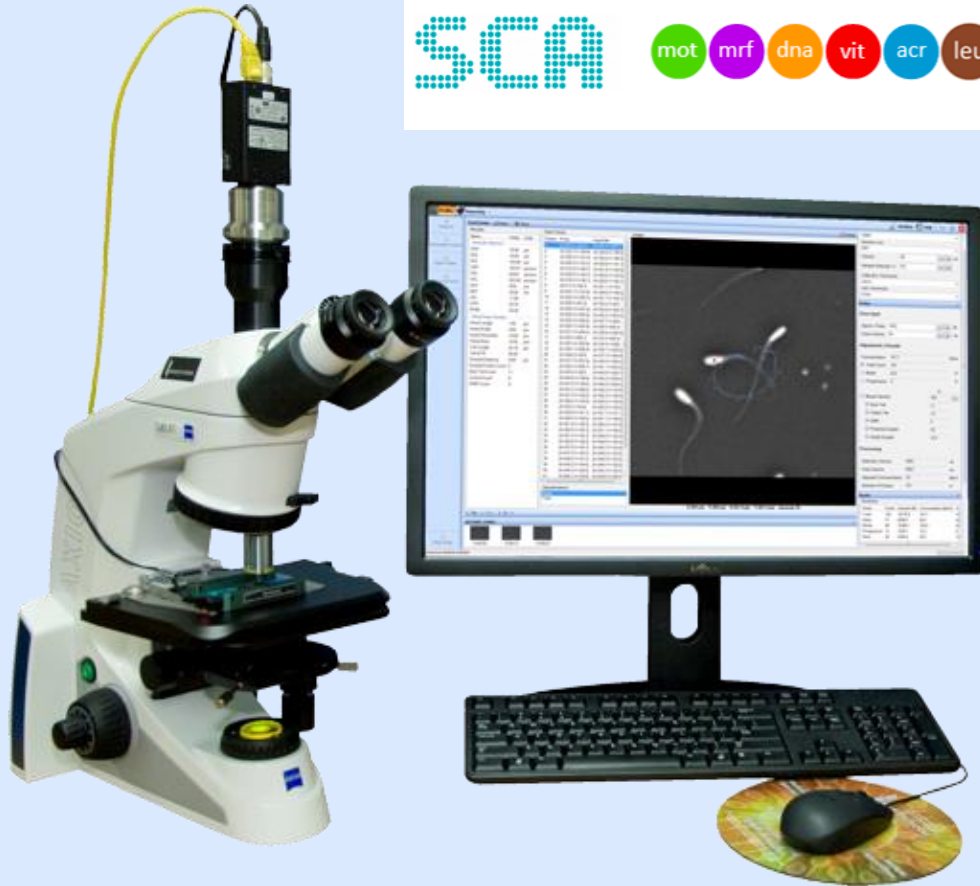
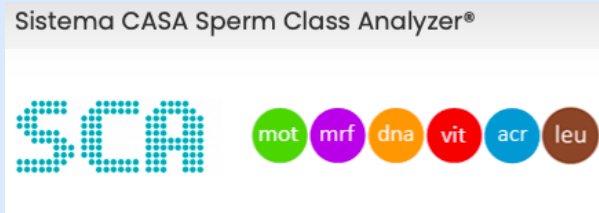
# Evaluación de los parámetros seminales



- **VOLUMEN** (1-2 mL)
- **CONCENTRACIÓN** (millones sp/mL)
- **MOTILIDAD MASAL**
- **MOTILIDAD INDIVIDUAL**



# Evaluación de los parámetros seminales

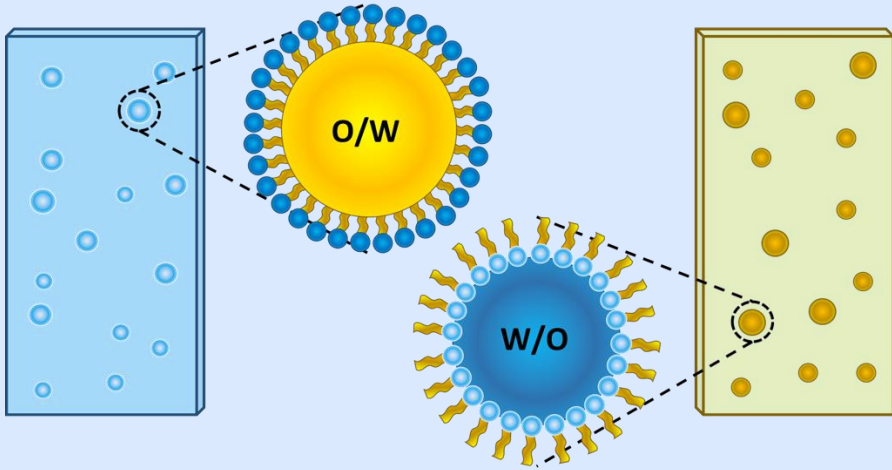


# CITOMETRÍA DE FLUJO



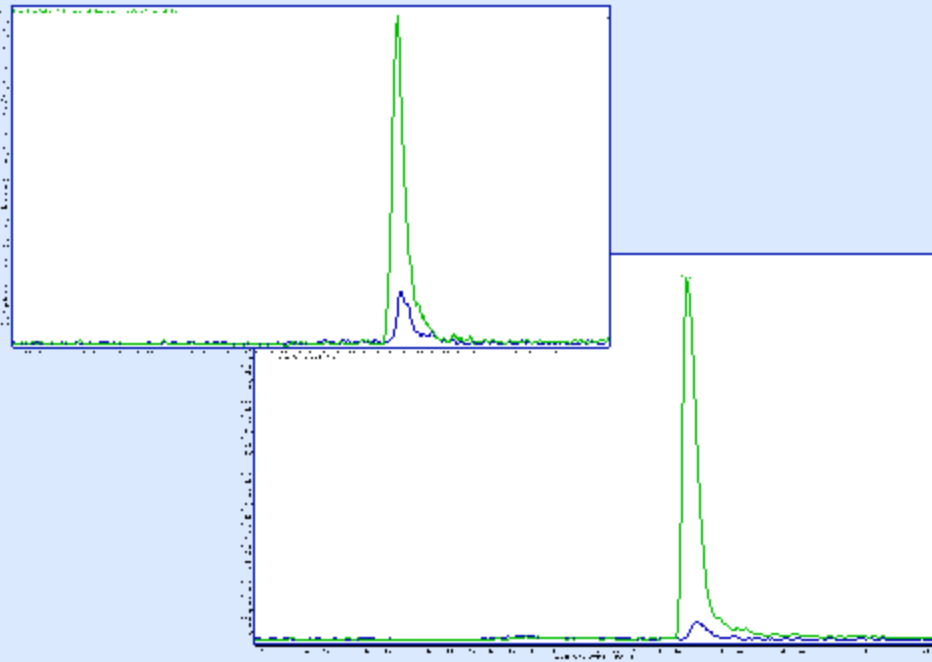
## Evaluación específica del estado de los espermatozoides:

- Viabilidad
- Estado del acrosoma
- Actividad mitocondrial
- Fluidez de la membrana (capacitación)



05

**Algunos de nuestros resultados**





# NANOTECNOLOGÍA PARA MEJORAR LA EFICACIA EN EL TRANSPORTE DE MUESTRAS

## PROBLEMA:

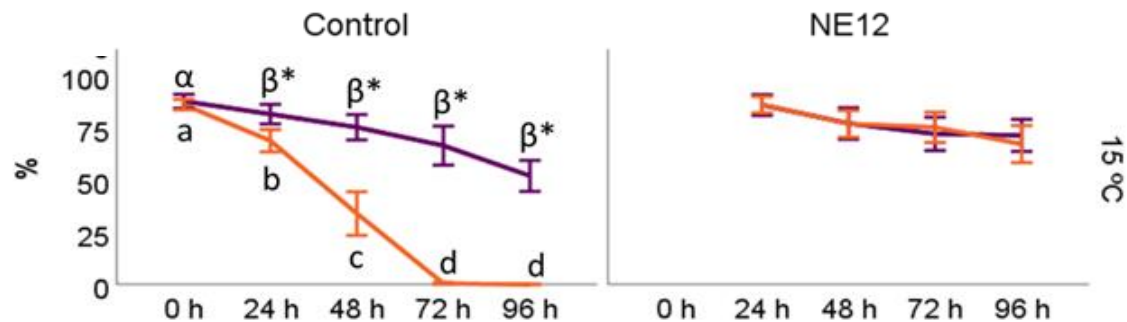
- Para distancias cortas el semen se transporta refrigerado entre 0-15 °C
- Los espermatozoides de ovino son muy sensibles al frío y estas temperaturas disminuyen su motilidad y viabilidad, y por tanto su calidad y capacidad de fertilización.

## PROPUESTA:

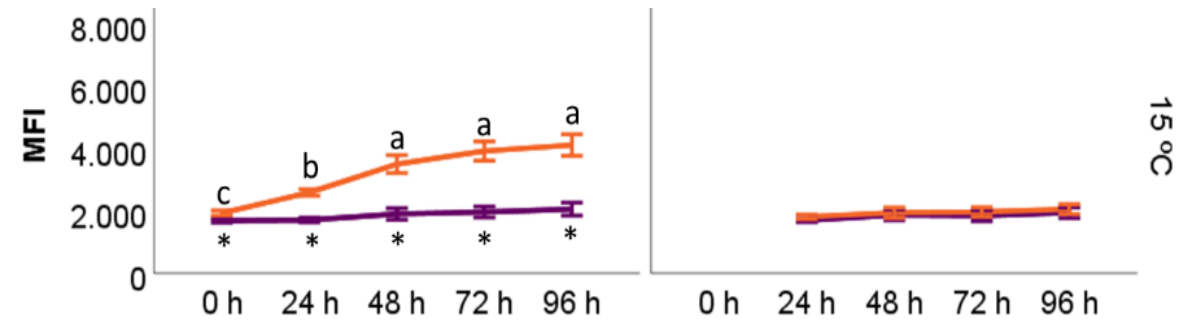
- Incorporar nanoemulsiones de Vitamina E para comprobar si disminuye la aparición de estos efectos negativos

# NANOTECNOLOGÍA PARA MEJORAR LA EFICACIA EN EL TRANSPORTE DE MUESTRAS

## b) Progressive motility



## b) Lipid peroxidation



— Non oxidative stress — Oxidative stress



## DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN **8-OHdG/2-dG** EN PLASMA SEMINAL MEDIANTE **LC-MS/MS**

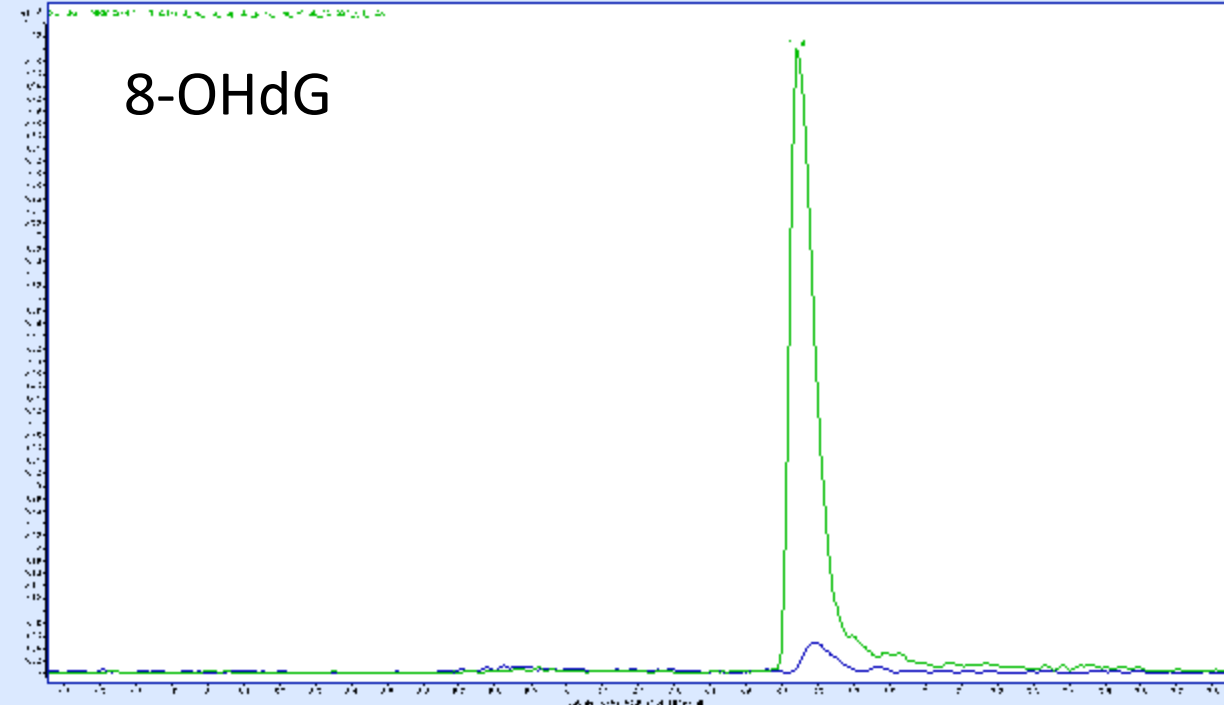
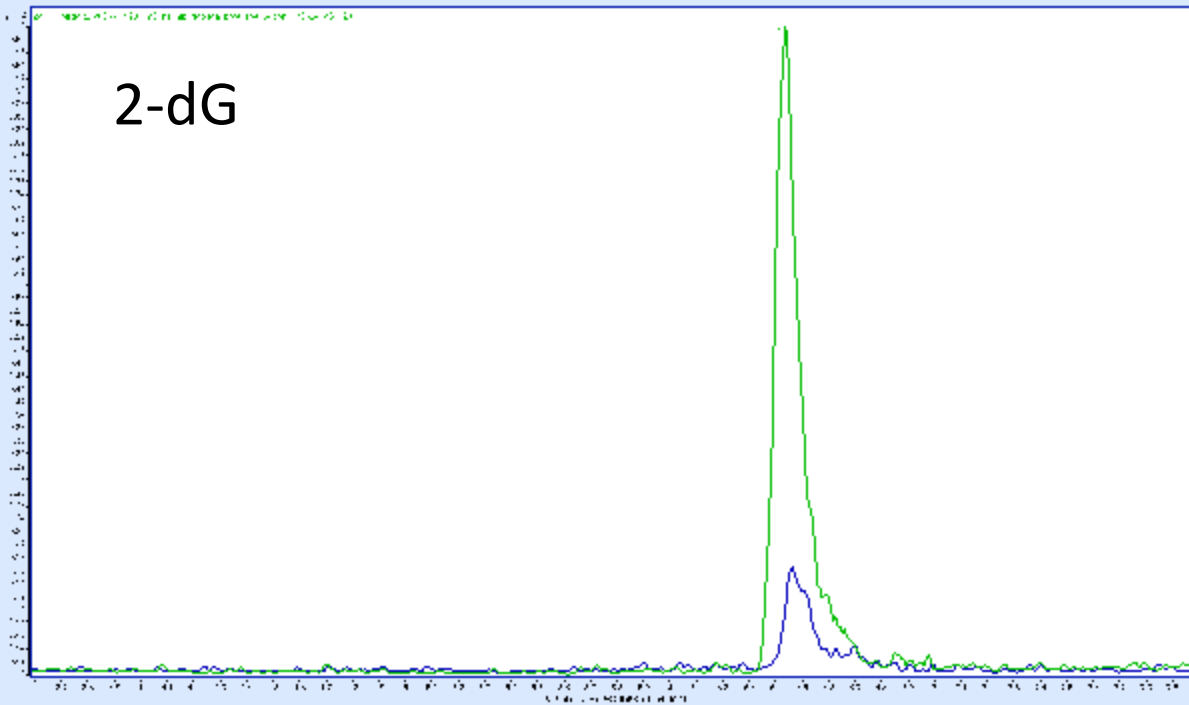
### **PROBLEMA:**

- Métodos basados en técnicas colorimétricas y fluorimétricas.
- Falta de sensibilidad y selectividad.
- Medición NO simultánea de los compuestos

### **PROPUESTA:**

- Primera metodología descrita mediante LC-MS/MS para determinar simultáneamente 8-OHdG/2-dG en plasma seminal.
- Determinación a niveles de ng/mL

DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN **8-OHdG/2-dG**  
EN PLASMA SEMINAL MEDIANTE **LC-MS/MS**



— Spiked 10 ng/mL

— Control



**Workshop de Investigación Facultad de Farmacia**  
"La Investigación nuestro mejor medicamento"  
25 de noviembre de 2024

# ¡MUCHAS GRACIAS!

# TURNO DE PREGUNTAS

Manuel Alfaro Gómez

**Grupo SaBio-IREC**

