

EVALUACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO DE LLAMA Y MUFLÓN

S. M. Giuliano, M. R. Ferrari, M. I. Carretero

Áreas de Física Biológica y Teriogenología, Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Argentina

E-mail: smgiulia@fvet.uba.ar

La cabeza de los espermatozoides de mamíferos está constituida en su mayor parte por el núcleo y éste a su vez por la cromatina, por lo tanto la forma y el tamaño de la cabeza están relacionados con el contenido y organización del ADN. Los mamíferos placentarios constituyen un grupo uniforme en cuanto al contenido total de ADN. El genoma haploide, en este grupo tiene valores cercanos a los 3 pg. La distribución del ADN en el núcleo espermático de mamíferos es característica de cada especie. Los espermatozoides morfológicamente anormales presentan perfiles de distribución de ADN que muestran marcadas diferencias respecto a los observados en espermatozoides normales (Ferrari *et al.*, 1998). La morfología del núcleo espermático, básicamente condicionada por las características de su cromatina, es uno de los parámetros que se correlacionan con la fertilidad. La evaluación morfológica del núcleo espermático y la evaluación de la condensación de la cromatina son importantes para la evaluación de la capacidad reproductiva del macho dado que las características macroscópicas y microscópicas de rutina del semen no indican si la cromatina del espermatozoide está alterada. Estos estudios cobran mayor importancia con la incorporación de biotecnologías como la inseminación artificial con semen criopreservado como con la incorporación de técnicas de reproducción asistida ya que la integridad de la cromatina de los espermatozoides se considera actualmente como un factor importante en la fertilidad masculina y en el desarrollo embrionario temprano.

En nuestro laboratorio se midieron el contenido haploide de ADN, los parámetros que caracterizan la distribución de la cromatina y las variables morfométricas principales del núcleo espermático normal de llama y de muflón. Para realizar los estudios sobre extendidos de semen se hizo la reacción de Feulgen según Ferrari *et al.* (1998) que es específica y estequiométrica para el ADN. Mediante micro espectrofotometría se determinó el contenido de ADN haploide utilizando eritrocitos de pollo como patrón. Además, se evaluó la distribución de la cromatina a través de características tales como absorbancia máxima y media, área y sus relaciones. El valor haploide medio obtenido en llama fue de 3,3pg (Giuliano *et al.*, 1997) y en muflón de $3,02 \pm 0,04$ pg. (Ferrari *et al.*, 2011). Los núcleos espermáticos de llama mostraron variabilidad en la distribución de su cromatina, permitiendo establecer cuatro tipos básicos de distribución. Asociada con esta variabilidad parámetros tales como el área, absorbancia máxima, absorbancia mínima y absorbancia media presentaron un amplio rango de variación. Al comparar los valores obtenidos en núcleos espermáticos de muflón y de ovino se observó que el contenido de ADN no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), mientras que el área nuclear sí presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambas especies. Estos resultados podrían indicar que estas especies tienen algunas diferencias en la organización y distribución de su cromatina.

Durante el pasaje de los espermatozoides a través del tracto genital del macho y especialmente en el epidídimo, los espermatozoides de mamíferos sufren cambios estructurales y bioquímicos, necesarios para alcanzar la óptima capacidad fertilizante. Estos cambios son considerados en conjunto maduración espermática y dentro de ellos, se ha descrito el reemplazo de las histonas por protaminas. Anormalidades en las protaminas o alteraciones en la proporción de estas proteínas pueden resultar en una disminución de la compactación de la cromatina espermática. Estas alteraciones de la cromatina han sido asociadas a subfertilidad en varias especies. Además espermatozoides con anormalidades en la cromatina podrían fertilizar un ovocito y producir embriones, sin embargo, se ha propuesto, que dichos embriones podrían no llegar a término o no originar individuos sanos. El colorante Azul de Toluidina (AT), ha sido utilizado para detectar defectos en la condensación de la cromatina en varias especies ya que el AT se une a los grupos fosfatos del ADN permitiendo diferenciar espermatozoides de acuerdo al grado de condensación de su cromatina. En nuestro laboratorio se puso a punto la tinción con Azul de Toluidina, la cual es una técnica sencilla y económica que permitió evaluar la condensación de la cromatina en espermatozoides de llama (Carretero *et al.*, 2009), guanaco (Carretero *et al.*, 2010a) y alpaca (Carretero *et al.*, 2010b). También, en nuestro laboratorio, se determinaron los patrones de condensación de la cromatina espermática en estas especies, se determinó que es posible utilizar DTT como control positivo de la tinción con AT y se determinaron los efectos de la estación del año (Carretero *et al.*, 2008), de la refrigeración y del uso de una solución de colagenasa (Carretero *et al.*, 2011) sobre la cromatina espermática de llama. Los

patrones de coloración observados en espermatozoides de Camélidos Sudamericanos fueron: coloración celeste (negativos, sin alteración en la condensación de la cromatina), violeta claro (intermedios, algún grado de descondensación), violeta oscuro (positivos, alto grado de descondensación). Dentro de los espermatozoides incubados con una solución de DTT al 1% se observaron dos categorías principales: reaccionados y no reaccionados con el DTT (positivos y negativos al AT, respectivamente). Dentro de los reaccionados se pudieron observar 3 subcategorías: (i) cabezas muy descondensadas (muy agrandadas, con presencia de un gran número de vacuolas), (ii) cabezas deformadas (agrandadas, con un número moderado de vacuolas) y (iii) cabezas con mantenimiento de la forma.

Cuando se estudiaron, en espermatozoides de llama, los efectos de la estación del año se observó un aumento significativo ($p=0,03$) de células con daño en su ADN (positivas + intermedias) durante el período estival. Los resultados indicarían que las condiciones ambientales durante el período estival podrían inducir un aumento de la descondensación de la cromatina de espermatozoides de llama (Carretero et al., 2008).

Para estudiar el efecto de la refrigeración sobre la cromatina espermática de llama, cada eyaculado se dividió en dos alícuotas iguales: una para evaluar semen fresco y otra para refrigerar. La refrigeración se realizó durante 24 hs. Se realizó un análisis de varianza considerando al macho como bloque y a cada tratamiento como factor fijo. Al comparar las muestras de semen fresco con el semen refrigerado se observó un aumento significativo ($p = 0,005$) de las células con un alto grado de descondensación (TB positivo), mientras que no hubo diferencias significativas ($P = 0,08$) entre el número de espermatozoides con descondensación moderada (TB intermedio). Sin embargo, se observó una tendencia a aumentar el número de espermatozoides con descondensación moderada en el semen refrigerado con respecto a las muestras de semen fresco. Es importante destacar el hecho de que el análisis morfológico de la cabeza del espermatozoide durante la evaluación de rutina no parece ser un parámetro adecuado para predecir el estado de la cromatina ya que no se encontró correlación entre anomalías de la cabeza espermática evaluada en la morfología de rutina y descondensación de la cromatina (espermatozoides TB positivo e intermedios) ($P > 0,05$). Para evaluar el efecto de incubar el semen con una solución de colagenasa sobre la cromatina de espermatozoides de llama los eyaculados fueron divididos en dos alícuotas: una se diluyó 4:01 en el 0,1% de colagenasa en H-TALP-BSA medio según protocolo descrito por Giuliano et al. (2010) y la otra alícuota no recibió tratamiento enzimático. Ambas alícuotas se incubaron 4 minutos a 37° C e inmediatamente después, se hicieron los frotis. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) al comparar el número de espermatozoides TB positivo o intermedio entre las muestras incubadas con o sin 0,1% de colagenasa. Estos resultados parecen indicar que esta enzima no produce descondensación de la cromatina, por lo menos a la concentración utilizada en este estudio, y por lo tanto puede ser utilizada para facilitar la manipulación de semen en llamas y puede ser incorporada en los diferentes protocolos de reproducción asistida en esta especie.

Se puede concluir que tanto la Reacción de Feulgen, que es estequiométrica para el ADN, como la coloración con Azul de Toluidina permiten evaluar el núcleo espermático de las diferentes especies, así como en los camélidos sudamericanos domésticos y silvestres, permitiendo de esta manera una mejor evaluación de la aptitud reproductiva del macho.

Referencia Bibliográfica

- Carretero, M.I., Giuliano, S.M., Casaretto, C., Gambarotta, M., Neild, D.M. 2009. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. In: *Vet* 11(1): 55-63. SSN (soporte papel): 1514-6634, ISSN (on line): 1668-3498.
- Carretero, M.I., Giuliano, S., Agüero, A., Pinto, M., Miragaya, M., Trasorras, V., Egey, J., von Thungen, J., Neild, D. 2010a. Guanaco sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. *Reprod. Fertil. Dev.* 22(1) 310.
- Carretero, M.I., Arraztoa, C.C., Casaretto, C.I., Huanca, W., Neild, D.M., Giuliano, M.S. 2010b. Alpaca Sperm Chromatin Evaluation Using Toluidine Blue. In: *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*. Lieke Boersma Editor, Wageningen Academic Publishers, p. 141-144.
- Evaluation of The Effect of Cooling and of The Addition of Collagenase on Llama Sperm Dna using Toluidine Blue. *Andrologia*, DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01170.x
- Ferrari, M.R., Spirito, S.E., Giuliano, S.M., Fernández H.A. 1998. Chromatin citophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. *Andrologia* 30: 85-89. ISSN 0303-4569.
- Ferrari, M. R., Spirito, S. E., Giuliano, S. M., Cisale, H. O. 2011. DNA content of Ovis musimon spermatozoa. *Andrologia* DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01160.x.
- Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., Miragaya, M. 2010. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Anim. Reprod. Sci.* 118 (1): 98-102.