LOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS CON CROMATINA ALTERADA ESTÁN DISTRIBUIDOS MORFOMÉTRICAMENTE EN DISTINTAS SUBPOBLACIONES

Nava-Trujillo, H. y Quintero-Moreno, A.
Laboratorio de Andrología, Unidad de Investigación en Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.
armando.quintero@fcv.luz.edu.ve

INTRODUCCIÓN

La asociación entre el Análisis Computarizado de la Morfometría Espermática (CASMA) y los programas de análisis estadístico ha permitido agrupar los espermatozoides bovinos en subpoblaciones espermáticas (SP) en función de sus dimensiones (Rubio-Guillén et al., 2007). Por otro lado, desde hace tiempo, la tinción nuclear "azul de toluidina" (AT) usada para evaluar la integridad de la cromatina espermática en semen de toro (Melo, 1982, Beletti et al., 2005, Nava-Trujillo et al., 2011) fue implementada para realizar el análisis morfométrico mediante el CASMA (Beletti et al., 2005, Oliveira et al., 2011), lo cual hace posible evaluar simultáneamente las dimensiones de la cabeza espermática y la integridad de la cromatina, así como la relación entre estos parámetros. Esta combinación podría aportar información relevante que mejore los resultados del espermiograma. De esta inquietud deriva el propósito de este estudio, el cual se basa en determinar las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides en semen criopreservado bovino y agruparlas en SP, para luego establecer el estatus de la cromatina (normal/ dañada) en función de cada SP.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización del experimento se utilizó semen criopreservado de 3 eyaculados de 5 toros (n=15) de raza Brahman con edades comprendidas entre 5 y 8 años, los cuales se procesaron en un centro especializado en la producción de semen bovino, ubicado en el estado Zulia, Venezuela, entre las coordenadas 10º 15' latitud norte y 72º 25' longitud oeste. Esta zona se clasifica agro-ecológicamente como bosque seco tropical. Los eyaculados fueron colectados entre las 5:00 y 7:00 de la mañana mediante vagina artificial con temperatura entre 42-46°C. Una vez obtenido el eyaculado se realizó la evaluación seminal de rutina y las muestras clasificadas como idóneas para congelar fueron procesadas en un diluyente diseñado para bóvidos y almacenadas hasta su descongelación y evaluación (Rubio-Guillen et al., 2007). Cerciorada su calidad, 3 pajuelas por cada toro, que contienen 30 x 10^6 espermatozoides se trasladaron al Laboratorio de Andrología de Universidad de Zulia (Venezuela) para realizar las evaluaciones complementarias que permitan capitalizar los objetivos planteados en este experimento. Se descongeló cada pajuela de semen sumergiéndola en un baño de María (BM) a 37 °C durante 30 segundos y luego se vertió su contenido en un vial de micro centrífuga de 1,5 ml, ubicado en una gradilla colocada en BM a 37°C.

La integridad de la cromatina espermática se determinó mediante la coloración con AT siguiendo el procedimiento empleado por Nava-Trujillo et al. (2011). Para evaluar los frotis teñidos previamente con AT se utilizó el CASMA de un programa disponible comercialmente (Spem-class Analyzer, Update SCA® v.3.4, Microptic, Barcelona, España). Los frotis teñidos con AT se observaron con un aumento de 400X y se evaluó en forma simultánea la integridad de la cromatina y las dimensiones de la cabeza de cada espermatozoide. Se clasificaron como espermatozoides con cromatina normal, aquellos teñidos de color azul claro, mientras que los teñidos de color azul oscuro o violeta, se consideraron como células con cromatina dañada; las cuales generalmente tienen una apariencia granular fina, lo que facilita su identificación (Barth y Oko, 1989).

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Los espermatozoides evaluados fueron seleccionados de acuerdo a sus dimensiones (largo, ancho, área y perímetro) usando un programa "k-means" que agrupa las observaciones en SP (1, 2, 3) mediante un análisis discriminante. Una vez establecidas las SP se realizó un Análisis de la Varianza para

determinar si existen diferencias entre éstas y se estableció un Chi-cuadrado para ver la relación entre la integridad de la cromatina (normal/dañada) y las SP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 2.273 cabezas espermáticas teñidas con AT fueron evaluadas para determinar simultáneamente sus dimensiones y la integridad de la cromatina espermática mediante el sistema CASMA; 70,35% presentaron su cromatina normal y 29,65% estaba dañada. El análisis de agrupamiento en función de la biometría de la cabeza espermática (longitud, ancho, área y perímetro) estableció tres SP. La SP_1 estuvo compuesta por los espermatozoides con las cabezas más pequeñas y representó el 6,29% de la población total. La SP_2 con un representación importante del 60,54% se caracterizó por espermatozoides con cabezas de tamaño intermedio; mientras que la SP_3 representada por el 33,17% contenía los espermatozoides de mayor tamaño.

El eyaculado de toro no está compuesto por una población homogénea de espermatozoides. Este conocimiento ha permitido agrupar los espermatozoides de un eyaculado en SP en función de su morfometría (Rubio-Guillén et al., 2007). Avalando aquellos resultados, este experimento verifica de nuevo que es factible agrupar tres SP morfometricamente distintas, la de dimensiones de cabeza pequeña (SP_1), intermedia (SP_2) y la de mayor tamaño (SP_3), además de observar diferentes proporciones en cada una de ellas, siendo la intermedia la de mayor porcentaje (60,54%). Esta información concuerda con los datos publicados por Rubio-Guillén et al. (2007) quienes describen una población intermedia predominante (50,45%) con similares características y concluyendo que la distribución es afectada por la criopreservación, la cual reduce también el tamaño de los espermatozoides. Este último hecho fue avalado dos años después (Gravance et al., 2009). Es interesante enfatizar que la SP predominante del eyaculado presenta la más baja proporción de espermatozoides con daño de la cromatina espermática. Al igual que en bóvidos, Nuñez-Martínez et al. (2007) describieron en cánidos una población intermedia predominante (SP_2) con una baja proporción de cromatina dañada y un 50% de espermatozoides pequeños (SP1) con cromatina dañada. De igual manera, en este experimento, en la SP_1 (con menores dimensiones) el 53% de los espermatozoides presentaron la cromatina dañada, lo cual podría deberse a fallas en la compactación de la cromatina (Beletti et al., 2010). En los espermatozoides de mayor dimensión (SP_3), el 42,31% presentan cromatina dañada, lo cual es una cifra elevada y no hay evidencias científicas que lo expliquen; sin embargo, se podría sugerir que un incremento de las dimensiones de la cabeza espermática se pudiese deber a la pérdida extensiva de protaminas que causaría una mayor descondensación de la cromatina. En semen humano, el porcentaje de espermatozoides teñidos positivamente con cromomicina A3, un indicador de deprotaminación, estuvo positivamente correlacionado con el porcentaje de espermatozoides macrocefálicos (Iranpour et al. 2000).

En conclusión, la tinción de azul de toluidina parece ser una técnica adecuada para la evaluación simultánea de la integridad de la cromatina y la morfometría de la cabeza espermática. Además, el análisis estadístico permitió identificar tres SP morfometricamente distintas y en las que el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada varió, siendo menor en la SP de cabeza intermedia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barth, A.D.; Oko, R.J. In: Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State Univesity Press. Pp 130-192. 1989.

Beletti, M.E., Costa, L. & Mendes, M. 2005. Braz J Mophol Sci. 22: 85-90.

Beletti, M.E., Lemos, M.S., Gama-Campos, M.N., Pinto, D.A. & Moraes, A.S. 2010. In: Proceedings of 15th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology (Abstract 57). São Paulo, Brazil.

Gravance, C.G., Casey, M.E., Casey, P.J. 2009. Anim Reprod Sci. 114: 81-88.

Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, Al-Taraihi TM, 2000. J Assist Reprod Genet. 1, 60-6.

Melo, M.S.L.1982. Histochemistry. 74: 387-392.

Nava-Trujillo, H., Quintero-Moreno, A., Finol-Parra, G., Vilchez-Siu, V., Osorio-Meléndez, C., Rubio-Guillén, J. & Valeris-Chacín, R. 2011. Rev Colomb Cien Pec**.** 24: 116-122.
Núñez-Martínez, I., Moran J.M. & Peña, F.J. 2007. Zygote 15: 257-266.
Oliveira, L.Z., Dos Santos, R.M., Hoseepian De Lima, V.F.M., Arruda, R.P., Andrade, A.F.C., Junior, V.G., Beletti, M.E. 2011. Livestock Sci. 141: 267-271.
Rubio-Guillén, J., González, D., Garde, J., Esteso, M., Fernández, M, Rodríguez-Gíl, J.E., Madrid, N. & Quintero-Moreno, A. 2007. Reprod Domest Anim. 42:354-357.

Tabla 1. *Distribución de las subpoblaciones en semen criopreservado de toros de acuerdo a las dimensiones de la cabeza espermática (Media ± Error estándar).*

Parámetros morfométricos	SP_1	SP_2	SP_3
Longitud (μm)	6,97±0,54[c]	7,77±0,007[b]	8,30±0,01[a]
Anchura (μm)	3,86±0,31[c]	4,18±0,004[b]	4,44±0,008[a]
Área (μm^2)	23,69±0,24[b]	28,51±0,02[b]	32,10±0,07[a]
Perímetro (μm)	19,03±0,11[c]	21,05±0,01[b]	22,57±0,06[a]
Distribución porcentual, % (n)	6,29 (143)	60,54 (1376)	33,17 (754)

Valores con diferentes letras en la misma fila (a>b>c) implican diferencias significativas (P< 0,0001).

La proporción de espermatozoides con daño en la cromatina estuvo incrementada en los espermatozoides con cabezas de menor (53,15%) y mayor tamaño (42,31%). La SP_2 (intermedia) que es la porcentualmente predominante del eyaculado presentó un porcentaje inferior (20,28%) y con diferencia estadísticamente significativa con las SP_1 y SP_3 (Tabla 2).

Tabla 2. *Distribución proporcional de los espermatozoides en cada subpoblación en función del estatus de integridad de la cromatina espermática (χ^2, P<0,0001)*

Subpoblaciones espermáticas	Integridad de la cromatina (%)	
	Normal	Dañada
SP_1 (n = 143)	46,85	53,15
SP_2 (n = 1376)	79,72	20,28
SP_3 (n = 754)	57,69	42,31

BULL SPERM WITH DAMAGED CHROMATIN ARE DISTRIBUTED DIFFERENTLY IN MORPHOMETRICALLY DISTINCT SUBPOPULATIONS

ABSTRACT: The aim of this study was to identify and characterize the morphometrically distinct sperm subpopulations (SP) stained with toluidine blue (AT) and to determine how sperm with damaged chromatin (DC) are distributed in each SP. To this, sperm of fifteen cryopreserved ejaculates from Brahman bulls were stained with AT, chromatin integrity status was determined to each sperm and simultaneously sperm head morphometry was determined using a CASMA software. Posteriorly statistical analysis to determine the number of sperm morphometrically distinct SP according to morphometric parameters (length, width, area and perimeter) was carried-out and the distribution of sperm with DC in each SP was evaluated. A total of 2273 sperm were analyzed, 70.35% with normal chromatin and 29.65% with DC. CLUSTER analysis identified three SP, smallest sperm-head (SP_1) with 6.29%, intermediate sperm-head (SP_2) with 60.54% and biggest sperm-head (SP_3) with 33.17%. Percentage of sperm with damaged chromatin was lower (P<0.05) in SP_2 (20.58%) in comparison with SP_1 (53.15%) and SP_3 (42.31%). In conclusion, cluster analysis identified three morphometrically SP in bull semen, and sperm with DC were presented in these SP, but SP_2 had lowest percentage of sperm with DC, suggesting that this SP has more stable chromatin.

Keywords: sperm subpopulation, morphometry, chromatin**,** toluidine blue.