CAMBIOS ESTACIONALES EN LA CALIDAD SEMINAL DE NEOMACHOS DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*): INTEGRIDAD DE LA CROMATINA

Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., Robles, V., Martínez-Pastor, F. y Herráez, M.P.
Dpto. Biología Molecular, Área Biología Celular, Universidad de León, 24071, León.
paz.herraez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

El uso de gametos de buena calidad es imprescindible para asegurar la descendencia y satisfacer la demanda del mercado de la acuicultura. Durante los últimos años ha cobrado importancia la evaluación del estado de la cromatina espermática, ya que se ha demostrado una relación entre su integridad y la capacidad fecundante (Evenson *et al*., 1999). Además, estudios recientes demuestran la importancia de algunos genes paternos en el control del desarrollo embrionario temprano (Delbés et al., 2010), de forma que las modificaciones de la cromatina podrían provocar efectos deletéreos, aumentando la tasa de abortos (Lin *et al.,* 2008). Se considera que el daño en el DNA es causado en gran medida por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), debida a la actividad celular y acrecentada en diferentes situaciones (Dietrich *et al*., 2005).

La producción de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se basa en la cría de progenies monosexo "todo hembras". Las técnicas empleadas para feminizar la población consisten en la utilización como reproductores de neomachos, hembras transformadas sexualmente en machos. Estos neomachos no desarrollan espermiductos por lo que los espermatozoides han de obtenerse sacrificando al animal y triturando el testículo. La suspensión obtenida contiene una mezcla de células somáticas y germinales en diferente fase de la espermatogénesis, carece de plasma seminal y no contiene las secreciones que se incorporan en los espermiductos (Robles *et al*., 2003). El esperma obtenido puede ser más susceptible de sufrir daños oxidativos, tanto por la ausencia de las secreciones antioxidantes, como por la presencia de células inmaduras, con mayor actividad mitocondrial (Pérez-Cerezales *et al.,* 2009). Por otra parte, los lotes de reproductores se encuentran sometidos a diferentes regímenes de fotoperiodo con el fin de conseguir maduración gonadal a lo largo del año. Hay datos que sugieren que la modificación del periodo de puesta modifica la calidad seminal (Robles *et al.,* 2003) y también afectará, posiblemente, a la estabilidad de la cromatina espermática. Nuestro objetivo es evaluar los posibles cambios estacionales en la integridad de la membrana y la cromatina a lo largo del año.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron muestras de neomachos de trucha arco iris, sometidas a fotoperiodo artificial, en diferentes momentos del año: diciembre, marzo, junio y septiembre. Los animales se sacrificaron siguiendo los procedimientos de la planta de producción y tras la limpieza del testículo se trituró y diluyo 1:10 (v:v) en solución maduradora DIMAT®. Tras 2h se evaluó, mediante citometría de flujo, la viabilidad y apoptosis, utilizando los marcadores Ioduro de propidio (IP) y YO-PRO1, así como el grado de fragmentación de la cromatina mediante el ensayo del cometa, siguiendo los procedimientos de lisis, electroforesis, tinción y cuantificación de la cromatina fragmentada que fueron puestos a punto en estudios previos (Pérez-Cerezales *et al.,* 2009). Para cada muestra se analizó el porcentaje de células cuyo ADN no presentaba fragmentación (0-15% DNAt), el de células con un nivel medio de fragmentación, posiblemente compatible con la capacidad de fecundar (5-15% DNAt), y el de células alto grado de fragmentación (≥15% DNAt), probablemente incompatible con la capacidad de fecundar. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 20 para Windows y el test SNK para la comparación de medias ($p<0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los resultados obtenidos a las 2 h de la recogida de muestras, refleja que la calidad seminal es óptima en los meses de diciembre y marzo, al principio y final del periodo natural de puesta, respectivamente, reduciéndose de forma muy acusada en el mes de junio, fuera del periodo natural de puesta. Así, en el mes de marzo la viabilidad fue superior al 90% (Figura 1) y el 85% de las células mostraron un grado de fragmentación inferior al 5% ADNt (Figura 2), grado que se considera compatible con la capacidad de fecundar y proporcionar una progenie sana y un reducido número de abortos (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010). Sin embargo, las muestras de junio presentaron baja viabilidad y altas tasas de fragmentación de la cromatina, reduciéndose el porcentaje de células no fragmentadas hasta menos del 50%. Las consecuencias de esta pérdida de calidad espermática pueden ser diversas. Por una parte es previsible que la reducción de las células viables disminuya la capacidad fecundante del semen, de forma que se requiera un mayor número de espermatozoides/huevo para conseguir altas tasas de fertilidad. Por otra parte hay que valorar la posibilidad de que una parte de los espermatozoides capaces de fecundar sean portadores de cromatina dañada, lo que incrementará las tasas de abortos y podrá tener consecuencias en el crecimiento y desarrollo de los embriones obtenidos (Pérez-Cerezales et al 2011).

Este es el primer estudio en el que se analiza la integridad de la cromatina a lo largo del año, revelando un importante efecto estacional. Los cambios observados en la membrana y el material genético podrían reflejar un aumento de los daños oxidativos, provocado por el incremento de temperatura del agua fuera del periodo natural de puesta. Las consecuencias para el desarrollo de la progenie deberán ser valoradas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K. 1999. Hum Reprod. 14: 1039-1049. • Delbes, C., Hales, B.F., Robaire, B. 2010. Molecular Human Reproduction, 16: 14–22. • Dietrich, G.J., Szpyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, L., Ciereszko, A. 2005. Theriogenology. 64: 1809-1822. • Lin, M.H., Kuo-Kuang., Lee, R., Li, S.H., Lu, C.H., Sun, F.J., Hwu, Y.M. 2008. Fertil Steril. 90: 352-359. • Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Cabrita, E., Martínez-Pastor, F., de Paz, P., Herráez, M.P. 2009. Theriogenology. 71: 605-613. • Perez-Cerezales, S., Martinez-Paramo, S., Beirao, J., Herraez, M.P. 2010. Reproduction. 139: 989-997. • Pérez-Cerezales, S., Gutiérrez-Adán, A., Martínez-Páramo, S., Beirão, J., Herráez, M.P. 2011. Theriogenology. 71**:** 605-613. • Robles, V., Cabrita, E., Cuñado, S., Herráez, M.P. 2003. Aquaculture. 224: 203 - 212

Agradecimientos: El presente estudio ha sido financiado por la Junta de Castilla y León (proyecto LE365A11-2) y el MINECO (proyecto AGL2011-27787). V. Robles y F. Martínez Pastor son beneficiarios de contratos del programa Ramón y Cajal (RYC2008-02339, RYC-2008-02560).

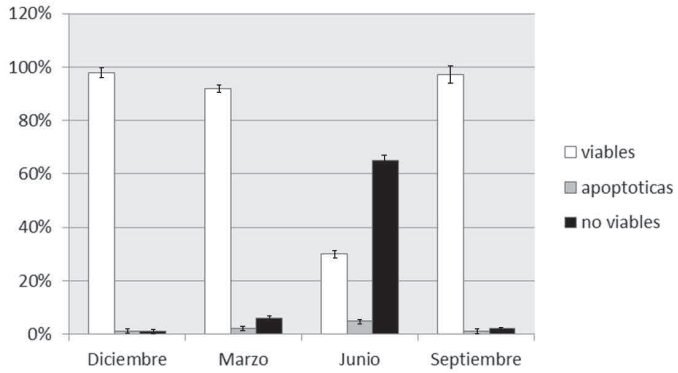


Figura 1. *Porcentajes de células viables, no viables y apoptóticas a lo largo del año*

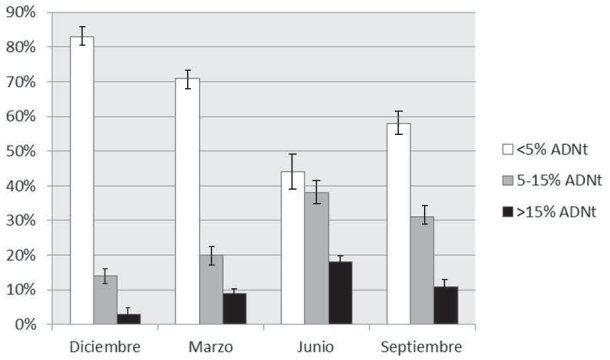


Figura 2. *Porcentajes de espermatozoides con diferente grado de fragmentación de la cromatina (ADNt) a lo largo del año.*

SEASONAL CHANGES OF QUALITY IN THE SPERM OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) NEOMALES: CHROMATIN INTEGRITY

ABSTRACT: The use of good quality gametes is of outmost importance in aquaculture. Commercial farming of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is frequently based on the use of sex reverted females (neomales) as breeders, kept under artificial photoperiod in order to avoid seasonality. Neomales sperm has a low antioxidant capacity and maturation at different thermal regimes could affect the sperm quality. Our objective was to analyze the seasonal variation on the integrity of plasma membrane and chromatin.

Sperm was sampled through a year (December, March, June and September) and cell viability and apoptosis were evaluated by flow citometry using the probes Propidium Iodide (PI) and Yo-PRO1. Chromatin fragmentation was analyzed using the Comet assay and the percentage of cells showing ranges of fragmentation (DNAt) from <5%, 5-15% and >15% where evaluated. Seasonality significantly affects the quality of samples. Sperm from December, at the natural reproductive season, showed more than 90% of viable cells and 85% of cells with non-fragmented chromatin, whereas in June the lower rates of cell viability and the higher rates of chromatin fragmentation where noticed. Data showed us that the quality of samples obtained out of season could compromise their fertilization ability and the success of further embryo development.

Keywords: rainbow trout, sperm quality, neomale, chromatin