LA COMPOSICIÓN DEL DILUYENTE INFLUYE EN LA DINÁMICA DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN EL MORUECO

Yániz, J.L., J. Gosálvez, J. , López-Fernández, C., Santolaria, P.[1]
[1]Grupo de investigación TECNOGAM, Instituto IUCA, Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Ctra. Cuarte S/N 22071 Huesca. jyaniz@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides que contienen ADN dañado potencialmente pueden competir con los espermatozoides con ADN normal, disminuyendo las tasas de éxito de la fecundación. Altos niveles de fragmentación de ADN espermático (SDF) se han asociado con peores resultados de fecundación de ovocitos, de gestación y de calidad embrionaria (Tesarik et al., 2004; Virro et al., 2004). La evaluación de la SDF del semen utilizado con fines de reproducción asistida tiene por lo tanto interés (Gosálvez et al., 2011). La evaluación de la dinámica de SDF por incubación *in vitro* proporciona información clave sobre los cambios de la integridad del ADN en los espermatozoides maduros, que normalmente no son revelados en la evaluación basal de SDF (López-Fernández et al., 2008; López-Fernández et al., 2010). Como las diferencias en la calidad del ADN espermático se han relacionado con la capacidad fecundante del eyaculado (Sakkas et al., 1995; Evenson, 1999), la cinética de la fragmentación del ADN puede ayudar a predecir la fertilidad potencial de una muestra determinada.

La composición de los medios utilizados para diluir muestras de semen puede tener un impacto sobre la magnitud del daño en el ADN y este aspecto debe ser estandarizado para una determinada especie para obtener resultados fiables. En este estudio examinamos el efecto de diferentes diluyentes en la dinámica SDF en espermatozoides de moruecos tras su incubación hasta las 24 h a 37ºC.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen de 24 eyaculados se recogió semanalmente con la ayuda de una vagina artificial de 6 moruecos adultos de la raza Rasa Aragonesa y se procesaron individualmente. Cada eyaculado se diluyó hasta una concentración de 800 x 10^6 espermatozoides/ml en 8 medios diferentes descritos en estudios previos (Yániz et al., 2005; Yániz et al., 2011): basados en leche, TRIS, citrato, MOPS, TES, HEPES y fosfato, y el diluyente comercial INRA96®. Las muestras de semen diluido se almacenaron en tubos de ensayo de vidrio y se incubaron a 37 ºC en un baño de agua. A las 0, 3, 6 y 24 h de incubación, el semen se diluyó hasta 20 x 10^6 espermatozoides/ml en PBS para evaluar fragmentación ADN espermático mediante la técnica SCD (Sperm Chromatin Dispersion test, Halotech-DNA, Madrid; López-Fernández et al.2008). Este test nos indica la presencia de roturas de la cadena de ADN en el espermatozoide tras colocar la muestra en una matriz de agarosa y someterla a un tratamiento químico. Al analizar la muestra con el microscopio de fluorescencia, los espermatozoides no fragmentados presentan halos compactos y pequeños, mientras que los que tienen el ADN fragmentado presentan halos grandes y dispersos.

Los valores obtenidos se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete SPSS versión 15.0. El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0,05$. Las diferencias de SDC entre diluyentes para cada tiempo de incubación se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA), seguidos por el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos de los diluyentes y tiempo de incubación en la SDF se muestran en la tabla 1. Se obtuvieron SDFs significativamente superiores a 6 y 24 h de incubación en el diluyente basado en leche que en los medios basados en sistemas tampón (Tabla 1). A las 24 h de incubación, el semen diluido en el medio INRA96 también alcanzó un SDF mayor que MOPS, TRIS, citrato y fosfato (Tabla 1).

Las causas subyacentes del efecto del diluyente en la cinética de fragmentación del ADN no están claras pero, dado que los diluyentes utilizados tienen diferente capacidad amortiguadora, las fluctuaciones de pH podrían jugar un papel importante. De hecho, en este experimento se evaluaron los cambios de pH de los medios durante la incubación y se observaron diferencias claras entre los diluyentes (datos no mostrados). El pH más bajo de los medios basados en leche y el INRA al final del período de incubación son coincidentes con niveles más altos de SDF en estos diluyentes. Un estudio previo en los seres humanos demostró que la exposición a pH ácidos puede

ocasionar daños en el ADN (Santiso et al., 2012). Curiosamente, este efecto sólo puede ser evaluado cuando se realiza un enfoque experimental dinámico, pero el efecto negativo debe tenerse en cuenta cuando es necesaria una entrega de semen a largas distancias para realizar la inseminación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Evenson, D.P. 1999. Reprod. Fertil. Dev. 11, 1-15.
- Gosalvez, J. 2011. Theriogenology 75, 197-205.
- Lopez-Fernandez, C. 2008. Theriogenology 70, 898-908.
- Lopez-Fernandez, C. 2010. Theriogenology 74, 1362-1370.
- Sakkas, D. 1995. Biol. Reprod. 52, 1149-1155.
- Santiso, R. 2012. Mut. Res. 734, 41-49.
- Tesarik, J. 2004. Hum. Reprod. 19, 611-615.
- Virro, M.R. 2004. Fertil. Steril. 81, 1289-1295.
- Yániz, J. 2005. Theriogenology 64, 1844-1851.
- Yániz, J.L. 2011. Small. Rum. Res. 95, 54-60.

Agradecimientos: Los autores agradecen al CITA (DGA) por su ayuda con la adquisición de muestras de semen. Este trabajo fue financiado por el MINECO (proyectos AGL2011-30353-C02-01 y BFU-2013-44290-R) y la DGA-FSE (proyecto A40).

Tabla 1. Efecto del diluyente sobre fragmentación ADN espermático (SDF) de semen de morueco durante la incubación a 37 ºC.

		Diluyente							
	h	leche	INRA	TRIS	MOPS	TES	HEPES	CIT	P
SDF (%)	0	3,8±0,95^{a}	2,8±0,91^{a}	2,4±0,65^{a}	1,7±0,45^{a}	1,9±0,51^{a}	1,0±0,32^{a}	1,6±0,23^{a}	1,0±0,24^{a}
	3	5,1±1,60^{a}	5,6±2,21^{a}	1,4±0,45^{a}	0,9±0,13^{a}	1,3±0,32^{a}	1,3±0,21^{a}	0,3±0,14^{a}	0,8±0,18^{a}
	6	11,0±1,83^{a}	8,3±2,11^{ab}	2,2±0,54^{c}	1,8±0,31^{c}	2,0±0,61^{c}	2,4±0,50^{bc}	1,7±0,41^{c}	1,5±0,55^{c}
	24	19,6±2,78^{a}	14,5±1,51^{ab}	2,1±0,47^{c}	3,0±0,86^{c}	7,3±1,85^{bc}	8,2±3,03^{bc}	3,2±1,20^{c}	2,7±1,1^{c}

INRA: diluyente INRA-96®; CIT: diluyente basado en citrato; P: diluyente basado en fosfato; $^{a-e}$: Diferentes entre filas, P < 0,05; $\bar{x}$ ± SEM; n = 24.

DILUENT COMPOSITION AFFECTS THE DYNAMICS OF SPERM DNA FRAGMENTATION IN RAM

ABSTRACT: This study was conducted to assess the effect of different semen extenders on the dynamics of sperm DNA fragmentation (SDF) in ram. Second ejaculates from 6 adult males were collected using an artificial vagina and diluted in either INRA-96®, milk, MOPS, TRIS, TES, HEPES, citrate or phosphate-based extenders. Semen samples were incubated at 37 ºC and the SDF were assessed after 0, 3, 6 and 24 h intervals. Significantly higher SDF indexes were obtained at 6 h and 24 h of incubation in the milk-based diluent than in all the buffer-based extenders. At 24 h, sperm diluted in INRA also reached a higher SDF than MOPS, TRIS, citrate, and phosphate-based extenders. The diluent had a clear impact on the pH of the samples, with MILK and INRA obtaining lower pH levels at the end of incubation period. It was concluded that the results of the dynamics of sperm DNA fragmentation are highly dependent on the diluent employed during incubation at 37 ºC, and this should be taken into account in studies evaluating this parameter.

Keywords*:* sheep, semen, extender, DNA fragmentation