ESTUDIO DE LOS NIVELES DE PROTAMINA1 Y FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN ESPERMA DE MORUECO EXTRAIDO EN PRIMAVERA Y VERANO

Sánchez-Espada AI, Serrano M, Martin B, Arroyo F, González C, Gosálvez J, y Roy R[1].
[1]c/ Darwin 2. Universidad Autónoma de Madrid. 28049. rosa.roy@uam.es

INTRODUCCIÓN

La cromatina del espermatozoide posee características excepcionales, se presenta altamente compactada y muy estable debido a los numerosos enlaces disulfuro que existen en sus proteínas, las protaminas. Se ha descrito una alteración de estas protaminas en pacientes con distintos niveles de daño en el DNA (Aoki et al., 2005). Por ello, se piensa que una de las funciones que tendrían las protaminas sería la de proteger el DNA del espermatozoide que tiene que ser introducido en el oocito (Oliva y Dixon, 1999). Una protaminación incompleta produciría un espermatozoide más vulnerable al efecto de agentes como las nucleasas, radicales libres o ciertos mutágenos (Sotolongo et al., 2003). Hay estudios recientes en toro llevados a cabo por Ganguly et al., (2013) en los que se ha visto un aumento de transcritos de PRM1 en espermatozoides con mayor motilidad. Por todo esto, sería interesante determinar los niveles de mRNA de genes, como los de las protaminas, relacionadas con la estructura de la cromatina del espermatozoide y que podrían estar relacionadas con una mayor susceptibilidad a la fragmentación, y así poder determinar con mayor exactitud el potencial fértil de una muestra seminal.

Entre las distintas pruebas que se pueden realizar, aquellas que determinan la fragmentación del DNA de los espermatozoides han adquirido una notable relevancia en los últimos años, ya que en muchos estudios indican que los espermatozoides con DNA defectuoso, pueden tener morfología, motilidad y capacidad de fecundación normal, pero no dar origen a gestaciones viables (Aitken y Krausz, 2001). Por tanto, sería lógico pensar que la transferencia de la molécula de DNA intacta del espermatozoide al óvulo es clave para que una fecundación pueda llevarse a término, especialmente si tenemos en cuenta que, hoy en día, los procesos de reproducción por monta natural en animales han sido sustituidos en muchos casos por procesos de reproducción asistida, dadas sus ventajas para la mejora genética, el aumento en la eficacia reproductora, el control y la prevención de enfermedades, y la reducción en el número de sementales de ganadería entre otras (Salamón, 1990).

En este trabajo hemos estudiado nuevos parámetros que pueden ser usados en los análisis de calidad seminal. Actualmente con la inseminación artificial y con las nuevas metodologías de reproducción asistida es necesario de disponer de parámetros que nos permitan predecir con mayor precisión el poder fecundante de una muestra seminal. Hemos analizado como varían la fragmentación de DNA y la expresión de mRNA para la protamina 1 *(PRM1)* en eyaculados extraídos en dos épocas distintas, con una variación de temperatura y de horas de luz entre ellas: primavera (mayo) y verano (agosto). Los resultados obtenidos muestran que en los eyaculados obtenidos en verano presentan niveles más bajos de fragmentación de DNA y niveles más altos de *PRM1*.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio han sido utilizadas muestras de espermatozoides frescas de 35 sementales ovinos de Raza Manchega del centro ovino de Valdepeñas. Todos ellos adultos (entre 2 y 4 años) y adiestrados para la recogida seminal con vagina artificial con hembra señuelo. Se hicieron 2 extracciones a los mismos sementales en fechas distintas: en primavera ("pri"), y en verano ("ver").

Extracción de DNA, mRNA y obtención del cDNA. A partir de muestras en las que se ha eliminado el plasma seminal mediante centrifugación. Se realizan dos lavados con una solución que contiene 110nM NaCl, 5mM KCl y 10mM MOPS [pH 7,4]. El DNA y RNA se extrae con Trizol® LS Reagent (Invitrogen).

Indice de fragmentación mediante SCDtest (Sperm Chromatin Dispersion test).Se ha usado el kit Sperm-Halomax (Chromacell, SL, Madrid) que permite dispersar *in situ* la cromatina de los espermatozoides, que han sido inmovilizados sobre microgeles adheridos a un portaobjetos. Para establecer el índice de fragmentación se cuentan 600 espermatozoides con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Figura 1). Se analizó el porcentaje de

espermatozoides con DNA fragmentado a partir de eyaculados frescos incubados a diferentes tiempos (0 h, 1,30 h, 4,30 h, 24 h y 48h).

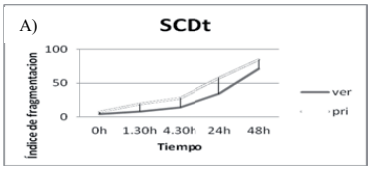
Caracterización del polimorfismo tipo SNP en el gen de la *PRM1*. Amplificación del fragmento de DNA que corresponde al gen de la *PRM1*. El tamaño del fragmento es 512pb (acceso GenBank: FJ900270.1). El genotipo de 61 muestras se ha establecido mediante secuenciación Sanger en un secuenciador capilar ABI Prism 3730 (Applied Biosystems).

Real time- PCR (RT-qPCR). Los cebadores específicos para llevar a cabo la Q-PCR se diseñaron a partir de la secuencia de *PRM1* depositada en GenBank. Uno de los cebadores estaba diseñado entre los dos exones, para evitar amplificar DNA genómico. Se utilizó SYBR Green y el ciclo utilizado fue: 40 ciclos de 3 min a 95ºC, 15 s a 95ºC y 30 s a 60ºC para la desnaturalización, anillamiento y extensión respectivamente.

Análisis estadísticos. Se utilizó el procedimiento de modelos lineales mixtos (MIXED) del paquete estadístico SAS (SAS Version 9.3; SAS Inst. Inc., Cary, NC). El umbral de significación establecido fue 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fragmentación de DNA aumenta con el tiempo transcurrido desde la eyaculación hasta las 48 horas de incubación. A tiempo 0 h, los niveles de fragmentación son muy bajos (entre el 2-3%) y es lo que llamamos fragmentación basal y equivaldría a la fragmentación debida a factores endógenos principalmente. En ambas épocas la fragmentación basal es muy similar, pero al estudiarla de forma dinámica vemos que en todos los tiempos de incubación obtenemos mayores niveles de fragmentación en las muestras obtenidas en primavera (Figura 1).



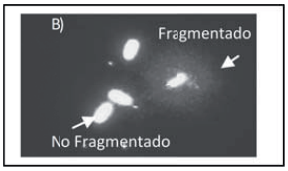


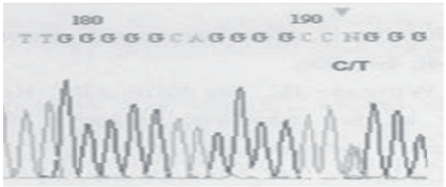
Figura 1. *A) Evolución del índice de fragmentación medio para muestras extraídas en verano (ver) y en primavera (pri), a diferentes tiempos con la técnica SCDt. B) Espermatozoide con halo (fragmentado).*

Al comparar la expresión del gen de la PRM1 en las dos fechas de colecta (primavera y verano), hemos observado que la tasa de expresión del gen *PRM1* sufre un aumento en las muestras recogidas en verano frente a las de primavera (FC = 1,4). Esto podría relacionarse con el fotoperiodo, con el acortamiento de los días que ocurre desde el solsticio de verano. En primavera sería una época más desfavorable reproductivamente que el verano. Hay estudios recientes en toro llevados a cabo por Ganguly et al., (2013) en los que se ha visto un aumento de transcritos de PRM1 en espermatozoides con mayor motilidad. Por tanto un aumento de transcritos de PRM1 podrían tener relación con una mayor la calidad seminal.

Se caracterizó un SNP (C/T) detectado en el gen de la *PRM1* ovina. De los 35 moruecos de los que disponíamos de muestras de semen no obtuvimos ningún individuo homocigoto para el alelo C. Ampliamos la muestra con 26 animales más y obtuvimos 4 CC (Figura 2). Este genotipo está en muy baja frecuencia. Debido a que esta transición ocurre en la zona intrónica, pensábamos que no debería tener un efecto, pero el hecho de no encontrar individuos CC en el centro de inseminación, puede indicar que tiene cierto efecto negativo.

Para los resultados de fragmentación obtenidos con la técnica SCDt, el efecto de la interacción genotipo del SNP detectado en el gen *PRM1* y la fecha de colecta (genotipo*fecha colecta) fue altamente significativo ($p<0,0001$), al igual que el efecto del tiempo (time) en que se midió la fragmentación ($p<0,0001$). En la tabla 1 se muestra el efecto de cada polimorfismo de la protamina en cada fecha (primavera o verano). Para el nivel de fragmentación del DNA espermático, el genotipo TT del gen de la protamina 1 presentó un índice de fragmentación significativamente ($p<0,0001$) superior, 9,8% más de

espermatozoides con DNA fragmentado, en las muestras tomadas en primavera (pri) frente a las colectadas en verano (ver). También para el genotipo CT el índice de fragmentación en las muestras de primavera fue significativamente ($p<0,01$) superior, 4,7% que la de las de verano. Los individuos TT presentan mayores diferencias en fragmentación dependientes de la época de colecta del semen que los heterocigotos CT. Así pues el genotipo del gen de la PRM1 podría estar relacionado con una mayor o menor fragmentación del DNA. Si estos resultados se confirman con un mayor número de muestras, este marcador podría ser utilizado para la selección de sementales con una mejor calidad espermática.



Protamina1 C/T$_{215}$		
Genotipo	**N**	**Freq**
CC	4	0,066
CT	26	0,508
TT	31	0,426
Alelo		
C	34	0,28
T	88	0,72

Figura 2. *Cromatograma del polimorfismo detectado en el gen de la PRM1 y* las *frecuencias genotípicas y alélicas en 61 machos de raza manchega.*

Tabla 1. *Contrastes genotipo*fecha colecta (primavera-verano)*

ES: error estándar, DF: grados de libertad

	Estimadores contrastes					
Técnica	Contraste	Estimador	ES	DF	Valor t	Pr > |t|
SCDt	CTver-CTpri	-4,7720	1,7164	291	-2,78	0,0058
	TTver-TTpri	-9,8674	1,6459	291	-6,00	<,0001
	CTver-TTver	1,9374	2,1955	291	0,88	0,3783
	CTpri-TTpri	-3,1579	2,1886	291	-1,44	0,1501

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Aitken R.J. & Krausz C. 2001. Reproduction, 122:497–506. ● Aoki V.W. et al. 2005. Journal of Andrology, 6(6): 741-748. ● Fernández J.L. et al. 2005. Fertil Steril, 84(4): 860. ● Ganguly I. et al. 2013. Res Vet. Sci, 94(2): 256-262. ● Oliva R. & Dixon G.H. 1991. Prog Nucleis Acid Res Mol Biol, 40: 25-94. ● Salamón S. 1990. Inseminación Artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia. España, 1-171. ● Sotolongo B. et al. 2003. Biol Reprod, 69: 2029-2035.

Agradecimientos: Este proyecto se ha llevado a cabo gracias a un proyecto financiado por la CAM: CCG10-UAM/SAL-5486 (PROTAGEN)

STUDY OF PROTAMINE1 LEVELS AND DNA FRAGMENTATION IN SPERM OF RAMS OBTAINED IN SPRING AND SUMMER

ABSTRACT: DNA damage is a proven infertility cause and causes problems in the developing embryo. It has been suggested that DNA integrity may be a marker more related to sperm quality. The evolution in time of this damage could be different depending on the degree and type of protamine forming sperm chromatin. These two parameters were studied on ejaculates obtained in spring and summer in 35 Manchega rams. We used the Sperm Chromatin Dispersion technique to measure DNA fragmentation and levels of mRNA for PRM1 by Q-PCR. An SNP C215T gene was detected in the PRM1 to see its possible relation to fragmentation and expression throughout the year. There are differences of expression within the same genotype in spring (pri) and summer (ver). In spring PRM1 gene expression decreases regardless of genotype. DNA fragmentation increases in spring, being higher in TT genotype males and lower in CT genotype ones. This variation in expression could be due to the action of photoperiod, This study could serve to obtain samples of better quality during the summer, selecting the best rams for using in AI.

Keywords: Protamine 1, DNA fragmentation, Fertility.