ANÁLISIS DE LA CROMATINA EN ESPERMATOZOIDES DE *BUFO CALAMITA*

Pardal, S., Crespo-Félez, I., Mata-Campuzano, M., Martínez-Pastor, F. y Arregui, L.
INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España, felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La cría en cautividad de anfibios tiene una importancia creciente, ya que las poblaciones silvestres se encuentran en su mayor parte amenazadas o en retroceso (Tascón, 2003, Gascon et al., 2005). Además, el desarrollo de técnicas de reproducción asistida tiene un papel fundamental para solventar los problemas de reproducción en cautividad y para permitir una adecuada la gestión genética, contribuyendo así a la conservación de estas especies. Un factor importante para la fertilidad espermática es la integridad de la cromatina. En mamíferos, las causas más comunes que afectan a la estructura de cromatina, principalmente causando fragmentación del ADN son: el estrés oxidativo —provocado por especies reactivas de oxigeno (ROS) (Akiten et al., 2010)—, la exposición a contaminantes, el aumento de la temperatura testicular normal y la edad (Agarwal et al., 2003). Para poder identificar estos daños de forma adecuada, es necesario disponer de un método preciso, repetible y que sea rápido y asequible. En el caso de los anfibios, sólo existe una publicación que aplica el test de dispersión de la cromatina espermática (SCD) en un anuro modelo (Pollock et al., 2014). Sin embargo, el *sperm chromatin structure assay* (SCSA), que se considera el test más fiable y repetible hasta el momento (Evenson, 2013), nunca se ha utilizado en una especie de este grupo. El objetivo de este trabajo fue testar y poner a punto un protocolo de SCSA en un anuro ibérico. El estudio de la fragmentación del ADN espermático y su dinámica es una herramienta importante para la conservación de los anfibios y en estudios sobre biología evolutiva de estas especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos generales fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), y el naranja de acridina fue comprado a Polysciences (Warrington, PA, USA). Se utilizaron 14 machos de *Bufo calamita*, que fueron capturados en el campo y mantenidos en cautividad hasta el fin de los experimentos. Para la inducción de la espermiación cada macho recibió una inyección intraperitoneal con 10 IU de gonadotropina coriónica humana por gramo de peso. Se analizaron 2 recogidas de orina espermática, separadas por 2 h, mediante estimulación de la micción o introduciendo un catéter a través de la cloaca. La concentración de cada muestra se estimó en un hemocitómetro, y se alicuotaron aproximadamente 2 millones de células en tubos con TNE (Tris-NaCl-EDTA). Estos tubos se congelaron y se mantuvieron a -80 °C. El análisis se realizó según Evenson y Jost (2000). Brevemente, 200 µL de muestra se trataron con 400 µL de solución ácida-detergente (150 mM NaCl, 0,1% Tritón X-100, 80 mM HCl, pH 1,2) durante 30 s, añadiéndose entonces una solución de tinción (150 mM NaCl, 100 mM ácido cítrico, 200 mM Na_2HPO_4, 1 mM EDTA). A los 3 min las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA), utilizando un láser azul (488 nm) y fotodetectores para fluorescencia roja (670LP) y verde (530/30). Se analizaron 5.000 eventos, analizando los datos con el paquete estadístico R (http://www.r-project.org) para obtener los parámetros del SCSA SD-DFI (desv. est. del DNA Fragmentation Index), %DFI (fragmentación del ADN) y %HDS (compactación de la cromatina) (Evenson y Jost, 2000; Evenson, 2013). Estos datos se analizaron mediante modelos lineares de efectos mixtos y mediante análisis de componentes principales (para estudiar el comportamiento de cada macho de acuerdo con los resultados en ambas recogidas). Los resultados se indican como media±desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica SCSA pudo ser utilizada para analizar los espermatozoides de *B. calamita*, obteniéndose los parámetros correspondientes. Los resultados mostraron una gran heterogeneidad entre machos y orden de recogida de muestra (figuras 1a y 1b). En la primera recogida, observamos valores de fragmentación e inmadurez bajos a moderados, de acuerdo con los datos disponibles en mamíferos (Evenson, 2014), que sugieren que valores de %DFI>30% y %HDS>15% están asociados a infertilidad. No obstante, tanto las estrategias reproductivas como la estructura de la cromatina espermática son muy

diferentes entre anfibios y mamíferos (Ausió et al., 2007), por lo que cualquier extrapolación sería, por ahora, aventurada. Los datos de %DFI (Figura 1a) fueron los más heterogéneos. La mayor parte de las muestras proporcionaron valores muy por debajo del 10% (2,6%±2,0) en la primera recogida, excepto un grupo que presentó valores algo más elevados (14,3%±3,4). En la segunda recogida, la mayor parte de los machos produjeron muestras con %DFI menor (2,6%±2,3; P=0,005). En cambio, los valores de %HDS (Figura 1b) fueron en general similares tanto entre machos como entre recogidas (6,2%±1,7). Estos datos indican que podemos conseguir espermatozoides maduros de *B. calamita* incluso en recogidas sucesivas, y que esta característica es común a distintos machos. En cuanto a los datos de fragmentación, éstos podrían reflejar una heterogeneidad de la población espermática en algunos machos. Es posible que en la primera recogida haya una mayor proporción de espermatozoides senescentes, los cuales se eliminarían principalmente en esa recogida, presentándose en menor proporción en las siguientes recogidas. No podemos descartar que los machos con bajo %DFI hubiesen eliminado esos espermatozoides espontáneamente antes de realizar las recogidas.

El análisis de componentes principales (PCA, Figura 1c) permitió caracterizar a los machos según los resultados obtenidos en ambas recogidas. Comprobamos que %HDS y las variables relacionadas con la fragmentación SD-DFI y %DFI eran casi ortogonales, indicando que la compactación y la fragmentación espermática son características independientes, como ha sido indicado anteriormente (Evenson, 2013; Mata-Campuzano et al., 2014). El PCA permitió agrupar a los machos en tres conjuntos según su cercanía en el espacio multidimensional definido por las tres variables en los dos tiempos de recogida. Así, el conjunto 1 agrupó a los machos con bajo %DFI en ambas recogidas. El conjunto 2 agrupó 2 machos con el %HDS más bajo en la segunda recogida. En el conjunto 3 se agruparon machos con %DFI moderado en la primera recogida. Dos machos quedaron excluidos al presentar los valores más elevados de %DFI (G) o %HDS (K). La evaluación de la cromatina espermática mediante SCSA, nos indicó que los espermatozoides de los machos de *B. calamita* utilizados en el estudio tenían en general unos niveles de fragmentación del ADN y de compactación aceptables, mejorando en una segunda recogida. Además, los datos obtenidos en esta técnica nos permitieron clasificar a los machos de acuerdo con el estado de la cromatina espermática en las recogidas sucesivas. Este tipo de análisis podrían ser utilizados para evaluar el impacto de distintos factores (manejo, contaminantes, etc.), así como en posibles técnicas de manejo reproductivo en anfibios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Agarwal, A., Saleh, R.A. & Bedaiwy, M.A., 2003. Fertil. Steril. 79(4):829-843. • Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., Hedges, A. & McLachlan. R.I. 2010. Hum. Reprod. 25(10):2415-2426 • Ausió, J., Eirín-López, J.M. & Frehlick, L.J., 2007. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 65:63-79. • Evenson, D.P., 2013. Methods Mol. Biol. 927:147-164. • Evenson, D. & Jost, L., 2000. Methods Cell. Sci. 22:169-189. • Gascon, C., Collins, J.P., Moore, R.D., Church, D.R., McKay, J.E. & Mendelson III, J.R. 2005 Amphibian Conservation Action Plan. IUCN. • Mata Campuzano, M., Alonso Molero, J. & Martínez Pastor, F., 2014. XXX Congreso Nacional SEF. Barcelona, España. • Tacon, A. J., 2003. FAO Fisheries Circular, 886, 5-29.

Agradecimientos: A la Comunidad de Madrid por los permisos de captura, las instalaciones y el equipamiento al Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid y al IBIOMED de la Universidad de León. Parte de este estudio fue financiado por el programa CAN grant 2013 del Zoológico de Menfis (EEUU).

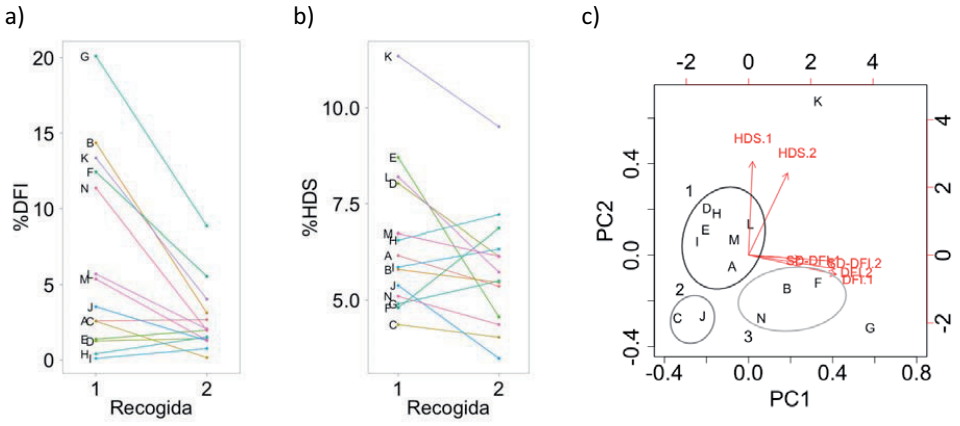


Figura 1. *Proporción de espermatozoides con fragmentación del ADN espermático (%DFI, a) o compactación-inmadurez de la cromatina (%HDS, b) en muestras de 14 machos (A-J) procedentes de dos recogidas separadas por 2 h. En cuanto a la fragmentación del ADN, se observa una gran heterogeneidad entre machos y entre ambas recogidas. La subfigura c muestra el resultado de un análisis de componentes principales utilizando las variables SD-DFI, %DFI y %HDS en las dos recogidas (1, 2). Destaca la distinta distribución de los machos y la independencia (ortogonalidad) entre las variables relacionadas con la fragmentación (SD-DFI y %DFI) y %HDS.*

ANALYSIS OF THE CHROMATIN OF *BUFO CALAMITA* SPERMATOZOA

ABSTRACT: The application of reproductive techniques is important for the conservation and farming of amphibians. Studies on the status of sperm chromatin are lacking on this group. Therefore, we have tested the sperm chromatin structure assay (SCSA) on 14 males of *Bufo calamita* spermatozoa. Spermiation was induced by hCG, and spermatozoa were analyzed in two successive collections separated by 2 h. DNA fragmentation (%DFI) was low or moderate, below cut-off values for mammals (30%), with males showing a great heterogeneity. Moderate values decreased in the second collection. Chromatin compaction (%HDS) was more homogeneous between males and mostly below 10%. A principal components analysis with SD-DFI, %DFI and %HDS at both collection times allowed to classify the males according their sperm chromatin characteristics and changes between recovery times. Moreover, fragmentation (SD-DFI and %DFI) and compaction (%HDS) were largely independent variables. SCSA could be useful for studying amphibian sperm chromatin for different purposes and regarding the application of reproductive techniques.

Keywords: Bufo, amphibians, SCSA, sperm chromatin.