ESTADO DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA Y RELACIÓN CON LA FERTILIDAD EN CAMPO EN DOSIS SEMINALES CRIOPRESERVADAS DE LA RAZA BOVINA AUTÓCTONA ASTURIANA DE LA MONTAÑA

Amer Salman[1], J. Néstor Caamaño[2], C. Arija[1], C. Tamargo[2],Carlos O. Hidalgo[2], C. Fueyo[2], A. Fernández[2], M.J. Merino[2], Felipe Martínez-Pastor[1]
[1]INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España
[2]Selección y Reproducción Animal-SERIDA, Principado de Asturias, Gijón, España
felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Los bancos de semen son una herramienta crucial para la conservación de las razas autóctonas. Dentro de la gestión de los criobancos es imprescindible realizar un control de calidad de éste para comprobar la viabilidad de las dosis criopreservadas. En este estudio, mostramos parte de los análisis realizados al banco de semen de la raza bovina autóctona Asturiana de la Montaña, que se encuentra en el Banco de Recursos Zoogenéticos del Principado de Asturias (Tamargo et al., 2009).

Uno de los parámetros más relevantes para la utilidad futura del semen es el estado de la cromatina espermática. Se ha demostrado que la fertilidad es seriamente afectada por los daños en el ADN espermático (Evenson, 2013), siendo estas alteraciones no compensables. Por tanto, la presencia de estas alteraciones en las dosis almacenadas en un criobanco podría comprometer muy seriamente su viabilidad futura. El estudio de las alteraciones de la cromatina espermática se reduce frecuentemente al análisis de las roturas del ADN, pero se ha propuesto que otros parámetros podrían ser relevantes. Entre ellos, la cantidad de puentes disulfuro entre protaminas, que podrían estar relacionados con la estabilidad de la cromatina (Zubkova et al. 2005).

En este estudio, hemos evaluado el estado de la cromatina espermática de las dosis de varios toros de Asturiana de la Montaña. Además de considerar la fragmentación del ADN espermático, hemos evaluado la madurez de la cromatina y la cantidad de puentes disulfuro, para conseguir un análisis más completo de la condición de estas muestras y de su utilidad futura. Adicionalmente, hemos analizado la relación de las alteraciones estudiadas con datos de fertilidad en campo de esas mismas dosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), Polysciences (naranja de acridina, Warrington, PA, USA) y Thermofisher (Waltham, MA USA). Se utilizaron dosis seminales de 20 toros de raza Asturiana de la Montaña almacenadas en el Banco de Germoplasma del Principado (SERIDA, Asturias). Los toros tenían entre 2 y 5 años de edad en el momento de la extracción (vagina artificial). Los resultados de fertilidad tras inseminación artificial (56 d non-return rates, NRR) se obtuvieron de registros para primeras y segundas inseminaciones.

Para los análisis de la cromatina espermática, las dosis se descongelaron a 37 °C 30 s en un baño de agua y a los 10 min se diluyó una alícuota en buffer TNE a 2×10^6 ml^{-1}. El semen se incubó 5 h a 38 °C (test de termorresistencia) y se volvió a muestrear. Los tubos se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis. Para evaluar la fragmentación del ADN y la madurez de la cromatina, se utilizó la técnica SCSA (Evenson y Jost, 2000). Se pasaron 200 µL de muestra a un tubo de citometría, añadiendo 400 µL de solución ácida-detergente (150 mM NaCl, 0,1% Tritón X-100, 80 mM HCl, pH 1,2) durante 30 s. Inmediatamente se añadieron 1,2 ml de solución de tinción (150 mM NaCl, 100 mM ácido cítrico, 200 mM Na_2HPO_4, 1 mM EDTA, 0,02 mM naranja de acridina). 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). Para determinar la cantidad de puentes disulfuro entre protaminas, se utilizó el fluorocromo monobromobimano (mBBr; Zubkova et al., 2005). Cada muestra se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se incubó 10 min a 37 °C en DTT 1 mM como referencia (tioles libres totales). Las alícuotas se lavaron con PBS y se incubaron con mBBr 500 µM durante 10 min a 37 °C. Se lavaron de nuevo y se resuspendieron en PBS con ioduro de propidio (PI) 3 µM, analizándose en un citómetro MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para identificar los

espermatozoides se seleccionaron los eventos PI+, usando un láser azul (488 nm) como excitación y un fotodetector de fluorescencia roja (655–730). Para evaluar los tioles libres (unidos a mBBr), se utilizó un láser violeta (405 nm) y se detectó con un fotodetector de fluorescencia azul (450/50). En ambas técnicas se analizaron 10.000 eventos por tubo. Los datos se procesaron con el paquete estadístico R (http://www.r-project.org) para obtener los parámetros del SCSA %DFI (fragmentación del ADN) y %HDS (madurez de la cromatina) (Evenson, 2013) y los valores medios de la fluorescencia (MFI) del mBBr. Se estimaron los puentes disulfuro por diferencia promedio de la alícuota referencia y la no tratada con DTT (Zubkova et al., 2005). Los datos se analizaron mediante modelos lineares de efectos mixtos. Los resultados se muestran como media±e.e.m. si no se indica lo contrario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la fertilidad en campo (NRR de 11 toros) fueron 57,3%±3,0 para primera IA y 54,5%±2,0 para segunda IA (distribución en Fig. 1a). Los resultados de fragmentación del ADN espermático (Fig. 1b) y de la madurez de la cromatina (Fig. 1c) mostraron que ninguna muestra alcanzaba valores que pudiesen comprometer la fertilidad (Evenson et al., 2013; Waterhouse et al., 2006). En ambos casos, la incubación a 38 °C no alteró significativamente los valores de estas variables (%DFI: 1,9%±0,2 vs. 2,0%±0.2; %HDS: 4,8%±0,3 vs. 4,5%±0,3). Gosálvez et al. (2011) indicó que la cromatina de los espermatozoides descongelados de toro Holstein era resistente al daño, característica que parece ser común en la especie bovina según nuestros resultados en Asturiana de la Montaña. El %DFI post-descongelación mostró una relación negativa con las NRR de primera IA (-5,40±1,93, P=0,003), aunque no con las de segunda IA o a las 5 h post-incubación. No se encontró relación entre %HDS y los datos de NRR.

Aunque se ha propuesto que la cantidad de puentes disulfuro podría afectar la integridad del ADN espermático, no se ha encontrado una relación clara en el caso del ganado bovino (Evenson et al., 2000). En nuestro caso, los puentes disulfuro tuvieron una dinámica difrente a la del SCSA (Fig. 2), con una disminución de la fluorescencia tras la incubación (Fig. 2a), indicando un mayor nivel de puentes disulfuro (Fig. 2c), con P<0,001 (los valores de referencia no variaron, Fig. 2b). Estos resultados indican que la estructura de la cromatina sí se ve alterada en el test de termorresistencia, pero en un sentido que podría contribuir precisamente a evitar alteraciones, explicando la falta de cambios del SCSA. No observamos una relación de los resultados de este análisis con el NRR.

En conclusión, el estado de la cromatina espermática de las muestras analizadas no supondría un problema para el uso futuro de estas muestras. A pesar del reducido número de muestras, encontramos cierta relación del SCSA con la fertilidad, lo cual indica que podría ser una herramienta interesante. Aunque no observamos esta relación con el análisis de los puentes disulfuro, la información proporcionada podría ayudar a comprender cómo se comporta el núcleo espermático en las técnicas de reproducción asistida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Evenson, D.P., 2013. Methods Mol. Biol. 927: 147-164. • Evenson, D. & Jost, L., 2000. Methods Cell. Sci. 22: 169-189. • Evenson, D.P., Jost, L.K. & Varner, D.D., 2000. J. Reprod. Fertil. Suppl. 56: 401–406. • Evenson, D.P., 1999. Reprod Fertil Dev 11: 1–15. • Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gouraud, A. & Holt, W.V., 2011. Mol. Reprod. Dev. 78: 951–961. • Tamargo, C., Fuente, J. de la, Rodríguez, A., Pérez-Garnelo, S.S., Fernández, A., Benito, J.M. & Hidalgo, C.O., 2009. Arch. Zootec. 58:529–532. • Waterhouse, K.E., Haugan, T., Kommisrud, E., Tverdal, A., Flatberg, G., Farstad, W., Evenson, D.P. & De Angelis, P.M., 2006. Reprod Fertil Dev 18:781–788. • Zubkova, E.V., Wade, M.& Robaire, B., 2005. Fertil. Steril. 84 Suppl. 2: 1191–1198.

Agradecimientos: Los autores agradecen a las asociaciones de ganaderos ASEAMO y ASCOL (Asturias) por su apoyo y a Beatriz de Arriba y Lucía Tejerina por su ayuda en los análisis. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos RZP2013-006-00-00 y RZP2017-00008-00-00 (MINECO) y ha sido realizado dentro de una Red de Excelencia (PIVEP, AGL2016-81890-REDT, MINECO).

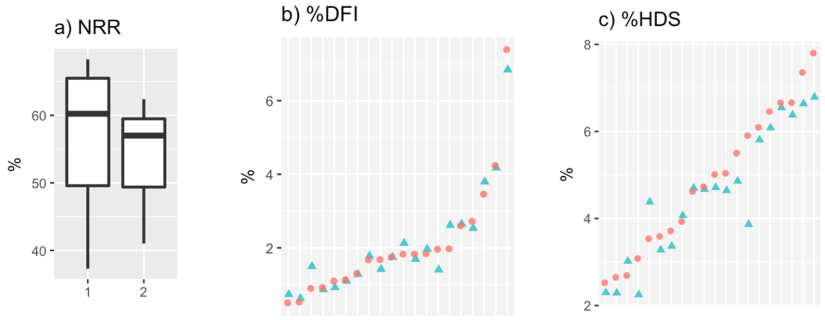


Figura 1. *El gráfico de cajas a) muestra la distribución de los datos de fertilidad (NRR) de los toros (n = 11) en primera y segunda IA. Las gráficas b) y c) muestran los resultados del SCSA para los 20 toros analizados tras descongelar (círculos) y tras 5 h de incubación a 38 °C (ordenados de forma creciente por valores post-descongelación).*

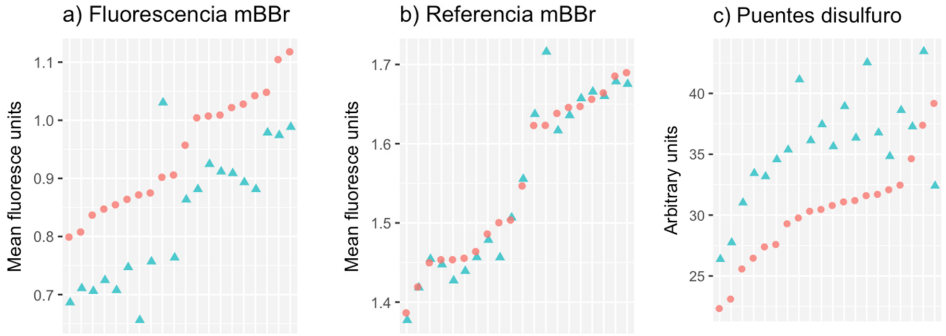


Figura 2. *Resultados del análisis de los puentes disulfuro en 20 toros, tras descongelar (círculos) y tras 5 h de incubación a 38 °C (ordenados de forma creciente por valores post-descongelación). Las gráficas a) y b) muestran los valores medios de fluorescencia (MFI) de las muestras sin descondensar y de referencia (descondensada con DTT), y la gráfica c) muestra el nivel de puentes disulfuro de cada muestra (calculado a partir de los MFI).*

SPERM CHROMATIN STATUS AND RELATIONSHIP WITH FIELD FERTILITY OF CRYOPRESERVED SEMEN DOSES FROM THE ASTURIANA DE LA MONTAÑA AUTOCHTHONOUS CATTLE BREED

ABSTRACT: Germplasm banks are crucial for the conservation of autochthonous breeds. We have analysed the chromatin structure of doses from the Asturiana de la Montaña semen bank (SERIDA, Asturias), in order to verify their viability for future use. The samples were assessed post-thawing and after a 5-h 38 °C incubation by using flow cytometry. We assessed DNA fragmentation (%DFI) and chromatin maturity (%HDS) by SCSA and disulfide bridges by monobromobimane (mBBr) staining. The SCSA results indicated that the chromatin of the cryobank doses was in good condition and should not represent a risk for future use. Incubation did not affect the SCSA results (0 h %DFI: 1,9%±0,2, %HDS: 4,8%±0,3; 5 h %DFI: 2,0%±0.2, %HDS: 4,5%±0,3). Moreover, post-thawing %DFI negatively influenced field fertility (non-return rates of first inseminations, P=0.003). The levels of disulfide bridges increased after the incubation (P<0.001) suggesting chromatin changes after thawing that could explain the resilience found by SCSA analysis. We found no relationship of disulfide bridges levels with field fertility. However, this analysis could help understanding the bull sperm chromatin dynamics after thawing.

Keywords: bull, sperm chromatin, fertility, germplasm bank.