COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA EN ESPERMATOZOIDES DE GALLO, A TRAVÉS DEL TRACTO REPRODUCTIVO, EVALUADA MEDIANTE CROMOMICINA A3

Bernal[1], B., Pérez-Cerezales[2], S., Behnamifar[3], A., Villaverde[2], S., Castaño[2], C., Toledano-Díaz[2], A., Velázquez[2], R., Gutiérrez-Adán[2], A., López-Sebastián[2], A., Blesbois[4], E., Santiago-Moreno[2], J. y Gil[1], M.G.
[1]Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid; [2]Dpto. Reproducción Animal, INIA, 28040 Madrid; [3]Departamento de Avicultura, Facultad de Agricultura, Universidad Tarbiat Modares, Irán; berenice.bernal.juarez@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los procesos de maduración de los espermatozoides de gallo a lo largo del tracto reproductivo son poco conocidos. La cromomicina A3 (CMA3) es un fluorocromo que compite con las protaminas para unirse al ADN y se ha utilizado para analizar el empaquetamiento de la cromatina en los espermatozoides de mamíferos (Simes *et al.*, 2009). El objetivo de este estudio fue evaluar la idoneidad de la CMA3 para analizar grado de maduración nuclear de espermatozoides de gallo durante su tránsito a lo largo de conducto deferente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 6 gallos de la raza Pardo de León. Los espermatozoides se obtuvieron *in vivo* mediante masaje dorso-ventral para obtener los eyaculados (E), y *postmortem* mediante lavado con diluyente Lake-Ravie de los testículos (T) y de 3 regiones del conducto deferente (proximal[V1], intermedia[V2] y distal[V3]). Tras su fijación en formaldehído al 4%, los espermatozoides fueron almacenados a -20ºC en etanol al 70% hasta su análisis mediante CMA3. Para ello los espermatozoides se diluyeron a 3×10^6 células/mL en tampón McIlvaine (McII) (pH 7, $MgCl_2$ 10 mM), conteniendo 0,5 mg/mL de CMA3, y se incubaron durante 2h a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se añadió 1 µl de yoduro de propidio para su posterior evaluación por citometría de flujo. Se utilizaron los eyaculados sin tratar y desprotaminados como controles negativos y positivos. La disminución de la intensidad de fluorescencia con CMA3 indicaba un aumento del contenido de protamina y, por tanto, un mayor empaquetamiento del ADN. Los resultados se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron un descenso ($P<0,01$) en la intensidad media de fluorescencia de T (693,8±30,2) frente a V1 (546,3±17,7), V2 (515,1±12,1), V3 (517,6±12,3) y E (491,4±16,1). El porcentaje de espermatozoides teñidos intensamente, es decir, con poca condensación de la cromatina fue superior ($P<0,05$) en T (52,4%±3,4) y V1 (39,3%±6,0) que en V3 (18,8%±4,7) y E (15,0%±5,2). No hubo diferencias entre V3 y E. Nuestros resultados revelaron la existencia de un proceso de maduración del espermatozoide de gallo durante su tránsito a lo largo del conducto deferente confirmando que los espermatozoides de gallo no completan el proceso de maduración en el epidídimo (Munro, 1935) a diferencia de lo que acontece en mamíferos.

CONCLUSIÓN

La CMA3 es un fluorocromo adecuado para analizar el grado de condensación de la cromatina en los espermatozoides de gallo y ha permitido establecer que la maduración espermática en esta especie continúa durante su paso a través del conducto deferente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Munro S.S., Motility and fertilizing capacities of fowl sperm in the excretory ducts. 1935. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 33: 255–257. • Simes R., Feitosa W.B., Mendes C.M., Marques M.G., Nicacio A.C., De Barros F.R.O., Visintin J.A., Assumpo M. 2009. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. Biotech. Histochem. 84: 79–83.

Agradecimientos: Esta investigación fue financiada por el proyecto europeo 677353 IMAGE (Horizonte 2020, Unión Europea), y el proyecto INIA RZP2015-00002-00-00.