

NOTABREVE

EVOLUCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN SEMEN CRIOPRESERVADO DE TOROS DE LIDIA

DEVELOPMENT OF DNA FRAGMENTATION IN SEMEN CRIOPRESERVATION OF FIGHTING BULL

Posado, R.^{1*}, Hernández, M.¹, García, J.J.¹, Bartolomé, D.J.¹, López-Fernández, C.² y Gosálvez, J.²

¹Unidad de Investigaciones Ganaderas. Instituto Tecnológico Agrario. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León. Salamanca. España. *ita-posferra@itacyl.es

²Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Universidad Autónoma. Madrid. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Reproducción. Andrología. Espermatozoide.

ADDITIONAL KEYWORDS

Reproduction. Andrology. Sperm.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar la curva de fragmentación del ADN espermático en semen criopreservado de 10 sementales de la raza de Lidia y observar su evolución a diferentes intervalos de tiempo preestablecidos.

Se descongelaron las dosis a 37°C y se incubaron durante 10 días a 38,6°C, simulando la temperatura corporal de la hembra. Se analizó el porcentaje de fragmentación del ADN espermático de cada muestra a las 4, 24, 48 y 72 horas y a los 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días de incubación utilizando el kit Sperm-Halomax®-Bos-FF (ChromaCell SL, Madrid, Spain) para microscopía de fluorescencia.

Los resultados obtenidos indican que: (i) Los niveles de fragmentación basal, así como la velocidad de degradación del ADN espermático a diferentes tiempos de incubación, presentan importantes diferencias interindividuales. (ii) A falta del estudio de un mayor número de muestras, se podría considerar que en esta raza, la integridad de la molécula de cromatina se rompe cuando el semen es incubado a una temperatura de 38,6°C, pero aún así, puede permanecer estable durante un prolongado período de tiempo.

Aquellos sementales con altos porcentajes de fragmentación y que acumulan daños en su ADN espermático rápidamente, tendrían escasas posibilidades de conseguir la fertilización. Por tanto, sería interesante conocer la curva de fragmentación

del ADN de cada muestra seminal criopreservada, porque proporcionaría información muy valiosa para establecer la mejor estrategia de reproducción asistida y esclarecer problemas de infertilidad o de falta de desarrollo embrionario cuando se aplican estas técnicas.

SUMMARY

The objective of the present study was to analyze the curve of sperm DNA fragmentation and its development during a pre-established period of time, in cryopreserved semen of 10 bulls from Lidia's breed.

Semen samples were thawed at 37°C and were preserved in incubation up to 10 days at 38.6°C, to emulate the corporal temperature in the female. Analysis of DNA fragmentation was assessed after 4, 24, 48, 72 hours and at 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 days of incubation from each sample. Sperm-Halomax®-Bos-FF kit (ChromaCell SL, Madrid, Spain) was used to determine this parameter, by fluorescence microscopy. The results obtained indicated that: (i) Basal levels of fragmentation, and the velocity of sperm DNA degradation between different times, presented variation among individuals. (ii) We can consider that in these breed, the nuclear chromatin integrity gets degraded when it is incubated at a temperature of 38.6°C and can remain stable for long periods of time.

Those bulls that present high percents of

Presentado al Congreso SERGA (2010, Asturias).

Recibido: 7-12-10. Aceptado: 13-4-11.

Arch. Zootec. 60 (231): 441-444. 2011.

fragmentation index and a high speed of damage accumulation have a low potential to achieve fertilization. Therefore, it would be interesting to determinate the curve of DNA fragmentation in each cryopreserved sample, because it would supply information when establishing the best strategy for use to assisted reproduction techniques and it could clarify infertility or embryonic development problems for artificial insemination protocols.

INTRODUCCIÓN

En las ganaderías de lidia, el sistema habitual de reproducción es la monta natural en libertad, pero cada vez es más frecuente el empleo de técnicas de reproducción asistida, como la inseminación artificial. Esta técnica permite la conservación de material fecundante de sementales extraordinarios para su posterior utilización en hembras seleccionadas, de tal forma que se pueden obtener ejemplares de elevado valor genético en un corto período de tiempo. Una vez realizada la extracción y valoradas las características seminales clásicas (concentración, volumen, motilidad, morfología), el semen es tratado para conservarlo en nitrógeno líquido. Debido al proceso de congelación, en todos los mamíferos la calidad seminal disminuye, sin embargo, la

especie bovina es una de las más resistentes, recuperándose un porcentaje de células óptimas de aproximadamente el 50% (Vishwanath y Shannon, 2000).

En este estudio se realizó el análisis basal y la dinámica de la fragmentación del ADN del núcleo espermático en dosis seminales criopreservadas de sementales de la raza de Lidia. Este nuevo parámetro de calidad seminal, facilita información sobre la estructura de la molécula de ADN, encargada de transmitir la información a la generación siguiente. Cualquier defecto en esta molécula puede ser reparada sin respetar la secuencia de ADN original para esa región del genoma y desencadenar efectos no deseables en el embrión.

Obtener más información a cerca de este parámetro, con vistas a incorporarlo en la evaluación rutinaria de calidad del esperma antes de practicar la inseminación artificial, ha sido el objetivo principal de este estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 10 muestras criopreservadas de sementales de la raza de Lidia procedentes de distintas ganaderías españolas. Las pajuelas fueron descongeladas a 37°C durante 45 s. Se obtuvo una alícuota de

Tabla I. Índices de fragmentación (%) a distintos períodos de tiempo (h: horas, d: días) del ADN espermático de 10 muestras seminales congeladas de toros de Lidia incubadas a 38,6°C. (DNA fragmentation index (%) at different periods (h: hours; d: days) of 10 frozen semen Fighting bulls samples incubated to 38,6°C).

IF	T0	4 h	24 h	48 h	72 h	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
T 1	13,0	88,7	95,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
T 2	2,0	61,0	69,0	91,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
T 3	1,0	23,0	70,3	80,0	85,0	97,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
T 4	9,0	9,7	6,3	19,0	90,3	93,0	96,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0
T 5	14,3	16,0	13,0	22,7	26,3	74,7	80,0	87,0	92,7	100,0	100,0	100,0
T 6	7,3	10,0	15,7	26,3	30,0	45,7	87,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
T 7	7,7	7,7	29,7	34,7	35,0	37,0	44,0	87,3	88,7	100,0	100,0	100,0
T 8	6,0	4,3	7,3	7,3	8,0	8,3	9,0	10,7	17,3	81,3	90,0	100,0
T 9	18,7	21,0	20,7	24,7	28,3	28,0	28,0	28,7	30,0	40,0	50,0	66,3
T 10	10,3	13,3	13,0	11,0	13,7	11,0	12,0	11,7	11,7	11,7	9,7	11,7

FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN SEMEN DE TOROS DE LIDIA

esperma que fue procesada al instante ó tiempo cero (T0), definido como el momento inmediatamente posterior a la finalización del proceso de descongelación de la pajuela. El resto fue incubado a 38,6°C simulando las condiciones fisiológicas del tracto reproductor de la hembra, obteniéndose alícuotas a las 4 h, 24 h, 48 h, 72 h y 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días. A cada intervalo de tiempo citado, se efectuaron análisis de fragmentación del ADN de cada muestra utilizando el kit Sperm-Halamax® (ChromaCell SL, Madrid, Spain) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se utilizó una solución de lisis específica para generar una depleción proteica controlada, que seguida de una coloración fluorescente del ADN, facilitó la discriminación morfológica de los núcleos dañados, permitiendo observar las roturas existentes en la molécula de ADN espermático. Los espermatozoides normales presentan un halo fluorescente pequeño y compacto alrededor del núcleo, mientras que los fragmentados presentan grandes halos de dispersión alrededor de la cabeza del espermatozoide. Se contabilizaron 500 espermatozoides por muestra para obtener el índice de fragmentación del ADN nuclear espermático (IF).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El IF basal encontrado para los distintos individuos a T0 osciló entre el 1 y 18,67%.

Los resultados de las dinámicas de fragmentación de los toros muestreados están recogidos en la **tabla I**.

Si se analizan los resultados individuales se observa que la fragmentación del ADN espermático del toro nº 1, presenta un valor del 13% a T0, mientras que a las T4 h de incubación el nivel aumenta drásticamente hasta el 88,70%.

En el caso del toro nº 2, la muestra presenta a T0 un valor del 2% que se eleva al 61% a T4 h, llegando prácticamente al 100% a las 48 h de incubación.

Al analizar la dinámica de la muestra del toro nº 3, la subida del IF es clara a las 24 h alcanzando un valor del 70,33%.

En el toro nº 4 el IF se mantiene bajo y más o menos constante hasta las 72 h, momento en que se produce un aumento drástico de la inestabilidad de la cromatina en el 90,33% de los espermatozoides de la muestra.

El toro nº 5 presenta un IF alto a partir de los 4 días de incubación, mientras que el toro nº 6 presenta la mitad de sus esperma-

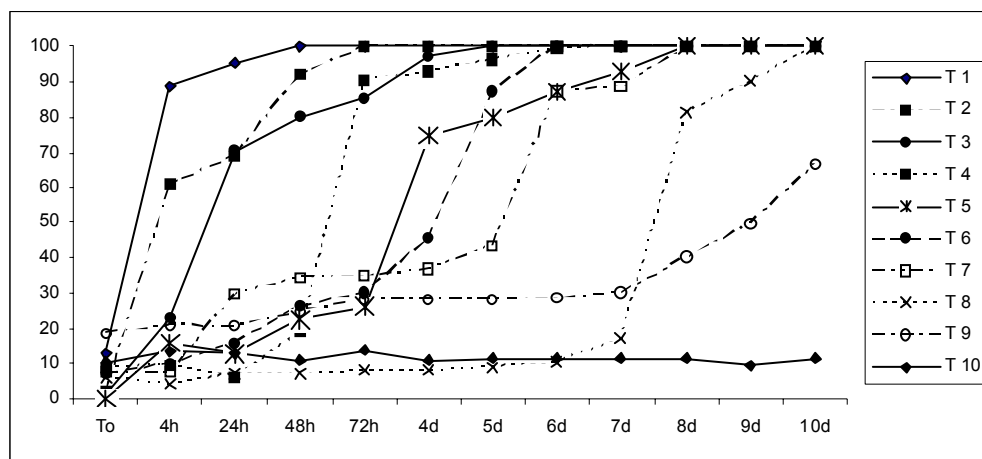


Figura 1. Evolución del IF en 10 muestras seminales criopreservadas de toros de Lidia. (Fragmentation index evolution in 10 cryopreserved seminal Fighting bull samples).

tozoides con el ADN fragmentado a los cuatro días, siendo prácticamente total a los cinco días de incubación.

En los toros identificados con los nº 7 y 8, la dinámica de fragmentación permaneció estable hasta el sexto y octavo día, respectivamente.

Resultó destacable la estabilidad de la cromatina en los toros 9 y 10. En el primer caso, la muestra presentó el 66,33% de los espermatozoides fragmentados a los diez días de incubación, mientras que en el segundo, los espermatozoides permanecieron intactos y estables en el tiempo, no presentando altos niveles de fragmentación tras diez días de incubación (11,70%).

Los resultados obtenidos indicaron que:

i) Tanto los niveles de fragmentación basal (T0) como los obtenidos a diferentes tiempos de incubación, varían en función del individuo considerado (**figura 1**), al igual que ocurre en las especies porcina (Pérez-Llano *et al.*, 2006) y ovina (López-Fernández *et al.*, 2008).

ii) Se puede considerar que, una vez descongelada la pajueta, la integridad de la molécula de cromatina espermática puede permanecer estable durante periodos prolongados de tiempo.

En condiciones fisiológicas, los espermatozoides de toro sobreviven aproximadamente 72 horas en la vagina de la hembra. Aquellos ejemplares en que se produce una elevación súbita del IF antes de las 72 h de incubación tienen menos probabilidades de conseguir la concepción y más de que aparezcan problemas en la descendencia, derivados del alto porcentaje de células con el ADN dañado que existen en el momento de

la fecundación.

CONCLUSIONES

La dinámica del %IF en individuos analizados en las mismas condiciones experimentales, presenta una gran variabilidad interindividual a diferentes intervalos de tiempo preestablecidos. Los resultados de este estudio indican que la incubación *in vitro* simulando las condiciones de temperatura del útero de la hembra, provocó un aumento progresivo de este parámetro en la mayoría de las muestras analizadas.

Es posible que este fenómeno contribuya a una disminución significativa en la calidad del esperma del semental, afectando a su capacidad fecundante, por tanto, determinar la dinámica de fragmentación del ADN de muestras criopreservadas de vacuno de lidia, puede facilitar información que permita seleccionar los mejores sementales a la hora de utilizarlos en técnicas de reproducción asistida, esclarecer casos de infertilidad inespecífica o en caso de problemas en el desarrollo embrionario después de utilizar la inseminación artificial.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Instituto Español de Genética y Reproducción Animal (IEGRA) su inestimable colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Trabajos financiados por Fondos FEDER, el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Instituto Tecnológico Agrario a través del proyecto *Implementación de nuevas tecnologías para la mejora de la producción del ganado de Lidia*.

BIBLIOGRAFÍA

- López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gosálvez, A., Arroyo, F., Vázquez, J.M., Holt, W.V. and Gosálvez, J. 2008. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. *Ram. Theriogenology*, 70: 898-908.
- Pérez-Llano, B., Enciso, M., García-Casado, P., Sala, R. and Gosálvez, J. 2006. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriology*, 66: 2137-2143.
- Vishwanath, R. and Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 23-53.