

Evaluación de la cromatina espermática de llama preservada mediante diferentes métodos de conservación

M.I. Carretero

Cátedra de Teriogenología, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA),
 Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

Evaluation of llama sperm chromatin preserved using different methods of conservation

ABSTRACT. South American camelids are internationally valued for their high quality fibre and their low cholesterol content meat. Thus, applying biotechnology in genetically superior animals would allow populations to be improved. Alternative methods of semen preservation such as desiccation and dehydration, which are easy to prepare and store and have a low cost, have been used in other species. These techniques have been used in our laboratory to preserve llama semen and two methods that evaluate sperm chromatin alterations have been developed: the Toluidin Blue stain and the Sperm Chromatin Dispersion technique. Additionally we have studied the effect different preservation processes have on llama sperm chromatin. We have observed an increase in chromatin decondensation in cooled semen when compared to the raw semen sample. When deep freezing semen, we have assayed two different cryoprotectors: glycerol (G) and dimethylformamide (DMF), both in a concentration of 7%; and two different stabilization temperatures: room temperature and 5°C. We observed that semen that was stabilized at 5°C and all freezing protocols showed a significantly higher number of sperm with chromatin condensation alterations, except semen frozen in Lactose-Egg yolk-Glycerol (LY-G) and stabilized at room temperature, which was not significantly different from raw semen. The processes of desiccation and dehydration do not alter chromatin condensation in semen preserved for a short time (up to 21 days). Nevertheless, increases in decondensation and a high level of sperm chromatin fragmentation were observed in desiccated and dehydrated samples when they were preserved for 2 and 4 months. The work carried out allowed evaluation of the effect different conservation methods have on the DNA of llama spermatozoa.

Key words: Preserved semen, sperm DNA, llama (*Lama glama*).

RESUMEN. Los camélidos sudamericanos son valorados internacionalmente debido a la alta calidad de su fibra y a su carne con bajo contenido de colesterol. Así, la aplicación de biotecnologías en animales genéticamente superiores permitiría mejorar las poblaciones. En otras especies, se han utilizado métodos alternativos de preservación de semen de fácil preparación, almacenamiento y de bajo costo, como la desecación y la deshidratación. En nuestro laboratorio, se han utilizado estas técnicas para preservar semen de llama y se han puesto a punto dos técnicas que evalúan alteraciones de la cromatina espermática: la tinción con Azul de Toluidina y la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática. Además, hemos estudiado el efecto que tienen diferentes procesos de preservación sobre la cromatina espermática de llama. En el semen refrigerado se observó un aumento de la descondensación de la cromatina con respecto al semen fresco. En el proceso de congelamiento profundo se probaron dos crioprotectores diferentes: glicerol (G) y dimetilformamida (DMF) ambos al 7% y dos curvas de estabilización: temperatura ambiente (TA) y 5°C. Se observó que el semen estabilizado a 5°C y todos los protocolos de congelamiento presentaron un número significativamente mayor de espermatozoides con alteración en la condensación de la cromatina, excepto el semen congelado con lactosa-yema de huevo y glicerol (LY-G) y estabilizado a TA, que no fue significativamente diferente al semen fresco. Los procesos de desecación y deshidratación no alteraron la condensación de la cromatina en el semen preser-

¹Autor para la correspondencia, e-mail: ignaciacarretero@fvet.uba.ar

vado a corto plazo (hasta 21 días). No obstante, se observó un aumento de la descondensación y un alto nivel de fragmentación de la cromatina espermática en el semen desecado y en el semen deshidratado cuando éstos fueron preservados durante 2 y 4 meses. Los trabajos realizados permitieron evaluar el efecto que producen distintos métodos de conservación sobre el ADN de espermatozoides de llama.

Palabras claves: Semen preservado, ADN espermático, llama (*Lama glama*)

Introducción

Los camélidos sudamericanos son valorados internacionalmente debido a la alta calidad de su fibra y a su carne con bajo contenido de colesterol. En la llama, las características que determinan el precio de la fibra están sujetas a modificaciones por selección genética (Frank, 2004). Así, la aplicación de biotecnologías en animales genéticamente superiores permitiría mejorar las poblaciones.

Se han utilizado la refrigeración (Vaughan *et al.*,

2003; Giuliano *et al.*, 2006) y el congelamiento profundo (Bravo *et al.*, 2000, Aller *et al.*, 2003, Vaughan *et al.*, 2003) de semen para preservar espermatozoides de alpaca y llama, sin embargo, los porcentajes de preñez han sido menores a los obtenidos en otras especies, aun cuando los espermatozoides conservan la movilidad y funcionalidad de sus membranas (Giuliano *et al.*, 2006).

Métodos alternativos de preservación de semen

En otras especies se han utilizado métodos alternativos de preservación de semen, de fácil preparación, almacenamiento y de bajo costo. Imoedeme *et al.* (2003) utilizando espermatozoides de una muestra de semen desecada al aire, lograron la fertilización de ovocitos humanos mediante la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection). Las muestras desecadas pueden ser transportadas en portaobjetos a 5°C sin necesidad de crioprotectores ni conservación en nitrógeno líquido. Otro método de preservación, probado en ratones, es la deshidratación de espermatozoides en una solución hiperosmolar (Van Thuan *et al.*, 2005) que tiene las mismas ventajas que la desecación. Anteriormente se creía que el espermatozoide "moría" cuando permanecía desecado porque no presentaba movilidad y por consiguiente era incapaz de penetrar el ovocito. Con la técnica ICSI, la pérdida de movilidad no necesariamente significa una pérdida de habilidad para fertilizar el ovocito.

Con todo, el éxito de esta técnica es muy dependiente del material genético empaquetado en la cabeza del espermatozoide porque el daño del ADN influye de algún modo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA). En nuestro laboratorio, Alonso y col. (2007) lograron un 73,68% y un 43,66% de clivaje embrionario mediante la técnica de ICSI utilizando semen equino desecado y deshidratado y conservado 2 a 3 días a 5°C respectivamente. Sin embargo, estas técnicas hacen posible que espermatozoides con ADN dañado sean capaces de fertilizar y transmitir material genético defectuoso, con consecuencias adversas para el desarrollo embrionario (Aitken y Krausz, 2001). Otro punto a tener en cuenta es que las características seminales de rutina (movilidad, integridad y funcionalidad de membranas y morfología espermáticas) han sido utilizadas para evaluar la calidad seminal. Sin embargo, estas características no determinan la calidad del ADN espermático.

Técnicas de evaluación de la cromatina espermática de llama

En nuestro laboratorio, se han puesto a punto en llama dos técnicas que evalúan alteraciones de la cromatina espermática: la tinción con Azul de Toluidina (AT) y la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersion assay). El colorante AT se une al ADN y permite diferenciar espermatozoides de acuerdo al grado de condensación/descondensación de la cromatina, al detectar la ausencia o ruptura de puentes disulfuro. En semen de llama, guanaco y alpaca

hemos identificado 3 patrones de núcleos espermáticos teñidos con AT: coloración celeste (negativos, sin alteración en la condensación de la cromatina), violeta claro (intermedios, algún grado de descondensación), violeta-azul oscuro (positivos, alto grado de descondensación) (Carretero y col. 2009; 2010a; 2010b). Por otro lado, la técnica de SCD se basa en que cuando espermatozoides con ADN intacto son inmersos en una matriz de agarosa y expuestos a soluciones de lisis, la resultante

desproteínización del núcleo muestra halos de dispersión de la cromatina (los halos corresponden a "loops" de ADN unidos a la estructura nuclear residual ó "core") mientras que aquellos que tienen su cromatina fragmentada fallan en producir halos de dispersión. Los patrones de espermatozoides de llama observados con la técnica de SCD fueron: i) núcleos con halos grandes de dispersión de la

cromatina, ii) núcleos con halos intermedios, iii) núcleos con halos muy pequeños, iv) núcleos sin halos. Se considera que las categorías (i) y (ii) presentan su ADN intacto y las categorías (iii) y (iv) tienen su ADN fragmentado (Carretero no publicado). Ambas técnicas de evaluación de ADN (AT y SCD) resultan ser económicas, sencillas, precisas y rápidas de realizar.

Efecto de distintos métodos de preservación de semen sobre la cromatina espermática de llama

A partir de estas técnicas de evaluación de ADN, nuestro laboratorio ha estudiado el efecto que tienen diferentes procesos de preservación (refrigeración, congelamiento profundo, desecación y deshidratación) sobre la cromatina espermática de llama. Para todos los experimentos la colecta de semen se realizó mediante electroeyaculación bajo anestesia general mediante la técnica de Director *et al.* (2007). La refrigeración de semen se realizó según Giuliano *et al.* (2006) observando un aumento de la descondensación de la cromatina en el semen refrigerado con respecto al semen fresco (Carretero *et al.*, 2011). El proceso de congelamiento profundo se desarrolló según la técnica de Giuliano *et al.* (2010a). Se probaron dos crioprotectores diferentes: glicerol (G) y dimetilformamida (DMF) ambos al 7% y dos curvas de estabilización: temperatura ambiente (TA) y 5°C. Se observó que el semen estabilizado a 5°C y todos los protocolos de congelamiento presentaron un número significativamente mayor de espermatozoides con alteración en la condensación de la cromatina,

excepto el semen congelado con lactosa-yema de huevo-glicerol (LY-G) y estabilizado a TA, que no fue significativamente diferente al semen fresco (Carretero *et al.*, 2010c).

Para los procesos de desecación y deshidratación se procesó el semen con colagenasa al 0,1% para disminuir la filancia de los eyaculados y facilitar su manipulación (Giuliano *et al.*, 2010b). Procesado el semen, una parte se colocó sobre portaobjetos estériles que se secaron bajo flujo laminar (desecación) y el resto se colocó en las diferentes soluciones hiperosmolares (deshidratación). Las muestras se conservaron en heladera a 4°C. Los procesos de desecación y deshidratación no alteraron la condensación de la cromatina en el semen preservado a corto plazo (hasta 21 días). No obstante, se observó un aumento de la descondensación y un alto nivel de fragmentación de la cromatina espermática en el semen desecado y en el semen deshidratado cuando éstos fueron preservados durante 2 y 4 meses (Carretero, no publicado).

Conclusiones

Los trabajos realizados permitieron evaluar el efecto que producen distintos métodos de conservación sobre el ADN de espermatozoides de llama. La incorporación de estas técnicas de evaluación de

ADN a las evaluaciones de rutina, contribuirán a desarrollar protocolos de preservación de semen que sean efectivos, confiables y repetibles.

Literatura Citada

- Aller, J.F., G. E. Rebuffi, A. K. Cancino, y R. H. Alberio. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch. Zootec. 52: 15-23.
- Aitken, R.J., C. Krausz. 2001. Oxidative stress DNA damage and the Y chromosome. Reproduction, 122:497-506.
- Alonso, A, M. Miragaya, L. Losino, and C. Herrera. 2007. Intracytoplasmic sperm injection of equine oocytes using air-dried sperm or sperm stored in high osmolarity medium. Reprod. Fertil. Dev., 19(1): 301-301.
- Bravo, P. W., J. A. Skidmore, and X. X. Zhao. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Anim. Reprod. Sci. 62, 173-93.
- Carretero, M. I., S. M. Giuliano, C. I. Casaretto, M. C. Gambarotta, y D. M. Neild. 2009. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. Invet 11(1): 55-63.
- Carretero, M. I., S. M. Giuliano, A. Agüero, M. Pinto, M. Miragaya, V. Trasorras, J. Egey, J. von Thungen, and D. Neild. 2010a. Guanaco sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. Reprod. Fertil. Dev.; 22(1) 310-310.
- Carretero, M. I., C. C. Arraztoa, C. I. Casaretto, W. Huanca, D. M. Neild, and S. M. Giuliano. 2010b. Alpaca sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. In: Lieke Boersma (Ed.). Fibre production in South American camelids and other fibre animals. Wageningen Academic Publishers, 141-144.

- Carretero, M. I., S. M. Giuliano, C. M. Gambarotta, C. C. Arraztoa, M. J. Cantanzari, and D. M. Neild. 2010c. Effect of freeze-thawing on llama sperm chromatin. Preliminary results. *InVet*, 12(2): 250. ISSN 1514-6634.
- Carretero, M. I., S. M. Giuliano, C. I. Casaretto, M. C. Gambarotta, and D. M. Neild (2011). Evaluation of the effect of cooling and the addition of collagenase on llama sperm DNA using toluidine blue. *Andrología* DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01170.x
- Director, A., S. Giuliano, V. Trasorras, M. I. Carretero, M. Pinto, and M. Miragaya. 2007. Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *J. Camel Prac. Res.*; 14(2): 203-206.
- Frank, E. N. 2004. La necesidad del mejoramiento genético de la producción de fibra en Camélidos Sudamericanos. *Actas del 4º Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos, 2º Seminario Internacional del Proyecto DECAMA.*
- Giuliano, S., M. G. Chaves, A. Director, V. Trasorras, y M. Miragaya. 2006. Inseminación artificial con semen refrigerado en llamas. Resultados preliminares. IV Congreso Mundial sobre Camélidos. 11-15 de octubre, Santa María, Provincia de Catamarca, Argentina.
- Giuliano, S. M., S. M. Carretero, M. Caldevilla, A. Ferrante, R. Santa Cruz, and D. Neild. 2010a. Development of freeze-thawing protocol for llama semen. Preliminary results. *InVet*, 12(2): 269. **ISSN 1514-6634.**
- Giuliano, S. M., M. I. Carretero, M. C. Gambarotta, D. M. Neild, V. L. Trasorras, M. Pinto, M. H. Miragaya. 2010b. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Anim. Reprod. Sci.*, 118 (1): 98-102
- Imoedemhe, D., N. Oliva, A. Adam. 2003. Embryonic development following ICSI with human air dried sperms. ESHRE Annual Meeting, Madrid, Spain; Session 42, Abstract 178.
- Van Thuan, N., S. Wakayama, S. Kishigami, and T. Wakayama. 2005. New method for mouse spermatozoa without freezing. *Biol Reprod.* 72:444-450.
- Vaughan, J., D. Galloway, and D. Hopkins. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. N°03/104, Kingston, Australia.