



ESTADO DEL ADN ESPERMÁTICO EN TOROS (*Bos taurus taurus*): DIFERENCIA ENTRE PRIMER Y SEGUNDO EYACULADO

Batista, C.^{a,b}, Lopez, ^aA. , Petrocelli, H.^a

^aDepartamento de Producción Animal y Pasturas

^bEstudiante de Maestría en Ciencias Agrarias, Orientación Ciencia Animal.

Av. E. Garzón 780. CP. 12900. Montevideo

Resumen

Se estudió la fragmentación del ADN espermático en dos colecciones consecutivas de semen de 7 toros. El objetivo del trabajo fue estudiar el estado fragmentación de la cromatina espermática inmediatamente a la colecta. Las muestras fueron procesadas utilizando el Kit Sperm Halomax (*Bos taurus*) y luego fueron observadas en microscopio de fluorescencia, contabilizando un mínimo de 200 espermatozoides por preparado. Se observaron diferencias significativas ($P=0.016$) en la fragmentación del ADN espermático entre primer y segundo eyaculado presentando el segundo menor fragmentación del ADN espermático.

Summary

The fragmentation of the spermatic DNA was study in two consecutive collections of semen from 7 bulls. The aim was to study the state of spermatic chromatin immediately after collection. The samples were processed using Sperm Halomax (*Bos taurus*) Kit and were observed with fluorescence microscopy, counting a minimum of 200 spermatozoa per slide. Significant differences ($P=0.016$) in was observed between the first and second ejaculation, with the second ejaculate showing less fragmentation.

Introducción

El estudio de la fragmentación de ADN espermático en muestras de semen que serán utilizadas para reproducción artificial es un tema de interés. Los trabajos realizados en este tema en especies animales como el toro no son muchos. Más aún, si tomamos en cuenta que los estudios que evalúan la fragmentación de ADN espermático no se realizan en el momento inmediato a la colecta de semen, y tampoco utilizan dobles eyaculados consecutivos. Khalifa et al., (2008), encontraron diferencias entre primer y segundo eyaculado en la estabilidad de la cromatina espermática en muestras de semen de toros, colectadas por dos métodos distintos, y sometidas a un período de incubación y distintos manejos en laboratorio. En cerdos, Fraser et al. (2007) observaron niveles altos de fragmentación de ADN espermático en eyaculados únicos para distintos métodos de colecta y congelación. En carneros se han observado diferencias en la calidad de dos eyaculados consecutivos, reflejando efectos negativos en la fertilidad de los machos, sin embargo no evaluaron fragmentación del ADN espermático (Nel-Themaat et al., 2006). Hasta el momento no se han realizado estudios de la fragmentación del ADN espermático utilizando semen recién eyaculado, sin que haya sufrido algún proceso. Nuestra hipótesis plantea que existen diferencias en la

fragmentación de la cromatina espermática entre primer y segundo eyaculado en muestras observadas inmediatamente de colectado el semen. El objetivo del trabajo fue estudiar la fragmentación del ADN espermático inmediatamente a la colecta en dos muestras consecutiva de semen de toros.

Materiales y Métodos

El experimento fue realizado en un establecimiento dedicado a la extracción y comercialización de semen congelado de toros de distintas razas, GENSUR Ltda., ubicado en el departamento de San José. Se utilizó un total de 7 toros (2 Aberdeen Angus Negro, 2 Aberdeen Angus Colorado y 3 Polled Hereford) todos en actividad reproductiva con edades de 2 a 4 años, mantenidos a campo. Las colectas de semen se realizaron con vagina artificial en dos momentos del día a igual hora y con una diferencia de 30 minutos entre colectas. Fue evaluado un total de 24 eyaculados (2 en 4 machos, 4 en 1 macho y 6 en los 2 restantes) entre el 30 de octubre y 4 de diciembre de 2009. Inmediatamente a la extracción del semen, se utilizaron 10 μ L que fueron diluidos en 20 μ L de diluyente (TRIS). De esta dilución se tomó una alícuota de 16 μ L la cual fue procesada según el protocolo del kit utilizado (Sperm-Halomax (*Bos taurus*), Chromacel SL, España). Luego de teñidas las muestras se visualizaron con microscopio de fluorescencia (400X) utilizando cubo de excitación verde. Se evaluó el porcentaje de espermatozoides fragmentados sobre el total de contados. Se contó un mínimo de 200 espermatozoides por preparado (Figura 1). Para el análisis estadístico se implemento un modelo lineal (GLM) con paquete estadístico (SAS Institute, Cary, NC, 2006).

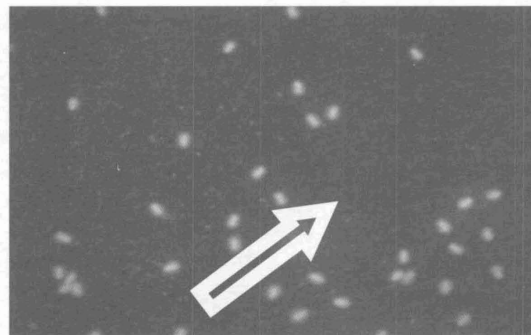


Figura 1. Espermatozoides con la cromatina normal y fragmentada (flecha). Microscopía de fluorescencia 400X campo oscuro, cubo excitación verde.

Resultados y Discusión

Se observó diferencia significativa ($P=0.016$) en la fragmentación del ADN entre primer y segundo eyaculado del mismo día para los toros evaluados. El segundo

eyaculado presentó una menor fragmentación del ADN espermático para todos los toros exceptuando uno, del cual solamente se evaluaron 2 eyaculados y donde el comportamiento de la fragmentación del ADN fue inverso. El valor promedio general (\pm EEM) de la fragmentación de ADN espermático fue de 6.1% (\pm 1%) y para el primer y segundo salto de 8.9% (\pm 1.3 %) y 4.2% (\pm 1.2%) respectivamente (Figura 2). No fueron observadas diferencias significativas entre toros ni entre razas.

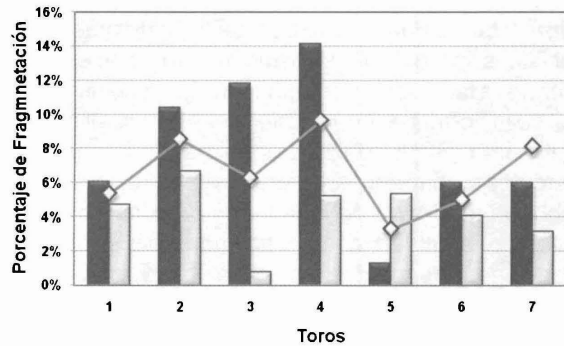


Figura 2. Porcentaje de Fragmentación del ADN espermático para primer y segundo eyaculado con promedio individual. Barras degradadas negras= Primer Salto. Barras blancas = Segundo Salto. Línea con marcadores = Promedio

El resultado de este trabajo demuestra que existen diferencias en la fragmentación de ADN espermático entre primer y segundo eyaculado. Estos resultados coinciden parcialmente con los de Khalifa et al. (2008) que evaluaron

la estabilidad del ADN espermático y obtuvieron diferencias entre primer y segundo eyaculado para la fragmentación del ADN espermático en eyaculados congelados.

Si bien las diferencias encontradas en la fragmentación de uno y otro eyaculado fueron significativas, por el hecho de utilizar un bajo número de animales y eyaculados, se debería continuar con los estudios. Además habría que evaluar si la diferencia observada en la fragmentación del ADN espermático afecta el resultado reproductivo.

Referencias

- Balhorn R, 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm, *Journal of Cell Biology*, 93:298-305.
- Enciso M, López-Fernández C, Fernández JL, García P, Gosálbez A, Gosálbez J, 2006. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy, *Theriogenology*, 65:308-316.
- Fraser L, Strzezek J, 2007. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing, *J Anim Sci*, 99:317-329.
- Khalifa TAA, Rekkas CA, Lymberopoulos AG, Sioga A, Dimitriadis I, Papanikolaou Th, 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa, *J Anim Sci*, 104:143-163.
- Nel-Themaat L, Harding GD, Chandler JE, Chenevert JF, Damiani P, Fernandez JM, Humes PE, Pope CE, Godke RA, 2006. Quality and freezing qualities of first and second ejaculates collected from endangered Gulf Coast Native rams, *J Anim Sci*, 95:251-261.