



### Alfonso Bolarín Guillén

Director de Calidad, Investigación y  
Desarrollo en AIM IBÉRICA

abolarin@aimiberica.com

## Integridad de la cromatina nuclear espermática: Aplicaciones en el análisis de semen de verracos\*

### Felipe Martínez Pastor

INDEGSAL (Instituto De Desarrollo Ganadero Y Sanidad Animal) Universidad de León, Campus de Vegazana, 24008, León (Spain)

\* Comentario a su participación en el Congreso Al Vets/Varna (Bulgaria) Septiembre de 2015.

Las alteraciones de la cromatina nuclear espermática pueden resultar en fertilidad y prolificidad disminuidas. A pesar de que la prevalencia de estas alteraciones es muy baja, el impacto económico de un verraco que produce semen sub-fértil es muy sig-

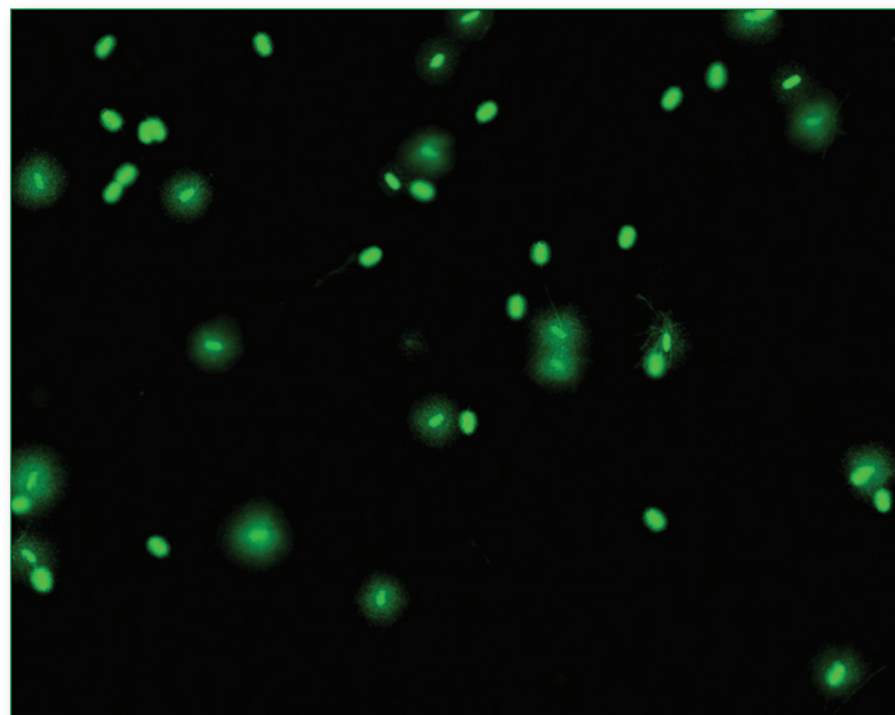
nificativo, tanto para el centro de inseminación artificial (IA) como sobre todo para la granja. Los defectos en la cromatina nuclear espermática son considerados defectos no-compensables; esto significa que el daño reproductivo que provocan no puede ser compensado añadiendo más espermatozoides en la dosis de IA (por ejemplo, estandarizando el contenido de espermatozoides motiles, o compensando los defectos de formas anormales con mayor concentración). Además, los mencionados defectos también dan lugar a mayor tasa de abortos y, en caso de éxito reproductivo, pueden dar lugar a defectos hereditarios en la camada. Por lo tanto, la detección temprana de estos machos defectuosos es deseable, así como su posible prevención (identificando los factores que provocan o predisponen la alteración).

Hay muchos tipos distintos de defectos cromatínicos espermáticos (dejando aparte alteraciones citogénicas tales como aneuploidias), y una miríada de técnicas para evaluar estos defectos en muestras seminales. La mayoría de la bibliografía actual discurre sobre defectos relacionados con la fragmentación del ADN nuclear espermático. Algunas técnicas detectan roturas del ADN nuclear espermático de forma directa o indirecta, tales como las técnicas TUNEL (*Terminal Transferase dUTP Nick End Labelling*), COMET ASSAY (*Electroforesis celular individual*), AOT (*Acridine Orange Test*), SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) o el SCD (*Sperm Chromatine Dispersion test; Sperm-Sus-Halomax®*). Disponemos numerosas publicaciones que estudian, comparan y validan estas técnicas, y que las utilizan para, por ejemplo, evaluar el efecto de la conservación (en fresco o congelado), relacionando el valor obtenido con resultados de fertilidad en la granja. El SCSA se ha relacionado con la tasa de partos y la fertilidad en numerosos estudios (Evenson y cols., 1994; Boe-Hansen y cols., 2008; Diddion y cols., 2009; Broekhuijse y cols., 2012). Además, se ha observado que un verraco cuya calidad de semen congelado-descongelado es muy mala (*Bad Freezer*) presenta mayor fragmentación del ADN nuclear espermático tras la descongelación (Hernández y cols, 2006). En realidad, estos aná-

lisis presentan una gran sensibilidad a estudios de toxicidad, evidenciando el efecto de algunas micotixinas sobre el semen de verraco (Benzoni y cols., 2008).

La sensibilidad del ADN nuclear espermático a la fragmentación es altamente dependiente del verraco. Por ejemplo, la edad del verraco se ha relacionado con inestabilidad cromatínica mediante el test de naranja de acridina (AOT) (Tsakmakidis y cols., 2012), presentando mayor incidencia verracos muy jóvenes y muy viejos. La variabilidad entre verracos también se ha puesto de manifiesto en relación a la fragmentación espermática en estudios de almacenamiento de semen refrigerado (Waberski y cols., 2011). En nuestro laboratorio, con semen criopreservado, se han observado los mismos resultados. Mientras que algunos verracos presentan valores de ADN nuclear espermático fragmentado consistentemente por debajo del 5%, no observándose en ellos ningún incremento tras la descongelación, otros verracos mostraron valores de fragmentación consistentemente por encima del 20% justo tras la descongelación.

Es interesante remarcar que la presencia de espermatozoides con el ADN nuclear fragmentado es relativamente baja en muestras de verracos normo-espermicos. Mediante la técnica SCSA, en humano o vacuno es típico el valor de corte del 30%. Sin embargo, el es-



**Imagen del test de dispersión de la cromatina espermática (SDC) tomada con Sperm-Sus-Halomax®. Cortesía del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, área de Reproducción y Obstetricia de la Universidad de Murcia.**

permatozoide porcino presenta niveles de fragmentación del ADN mucho menores, con un valor de corte establecido del 3-6%. De hecho, es sorprendente comprobar cómo el ADN nuclear espermático se mantiene con valores muy bajos de fragmentación incluso tras la incubación a 37°C tras su descongelación (Gosálvez y cols., 2011), teniendo en cuenta los bajos valores reproductivos obtenidos de estas dosis criopreservadas en el campo. Esto seguramente se debe a la estruc-

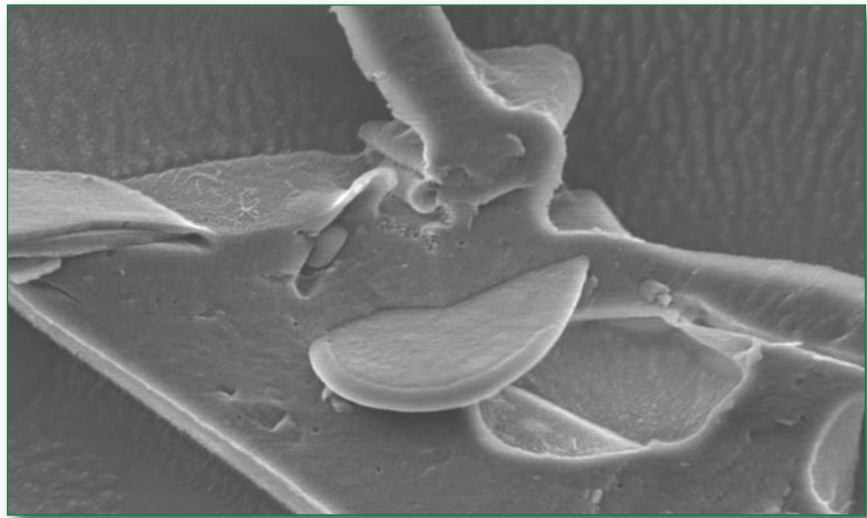
tura de la cromatina espermática en porcino, en la cual el ADN está muy establemente empaquetado.

Actualmente, nuestro equipo está realizando un estudio a gran escala en centros de inseminación de España mediante SCSA. En algunos resultados preliminares en 145 verracos de 2 centros de inseminación, sólo 10 verracos (7%) presentaron consistentemente valores de fragmentación de ADN superiores al 6%. La madurez cro-

matínica es un parámetro que también puede ser estimado por el SCSA, y sólo un verraco mostró en este caso alto nivel de inmadurez.

La peculiaridad del núcleo espermático porcino ha llevado a algunos investigadores a enfocarse en el análisis de los puentes di-sulfuro entre protaminas, los cuales son críticos en la alta condensación cromatínica observada. Cuantificando colorimétricamente los radicales libres de cisteína (que no forman puentes di-sulfuro), se evidencia que la criopreservación no sólo hace perder cromatina al espermatozoide, sino que también descompacta la estructura cromatínica (Yeste y cols., 2013). En este y en otros estudios (Yeste y cols., 2014), la estructura nucleoproteínica de los "malos congeladores" presentaba más radicales de cisteína libres tras la descongelación, ofreciendo una explicación plausible a la baja fertilidad de esos verracos.

La evaluación de la cromatina espermática podría ser implementada como parte del control rutinario de calidad en la producción de semen o en programas de almacenamiento de bancos genéticos (Waberski y cols., 2011). Esta implementación daría como resultado muy valiosa información no sólo sobre la calidad espermática, sino también sobre la salud general del verraco. El testaje repetido en dosis frescas refrigeradas ayudaría a



**Imagen de un espermatozoide congelado. Cortesía del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, área de Reproducción y Obstetricia de la Universidad de Murcia.**

determinar la aptitud de cada verraco para producir semen con mayor capacidad de conservación y por lo tanto fecundante. Además, si analizamos rutinariamente este parámetro en dosis congeladas-descongeladas, podría ayudar a clasificar a los verracos como "malos" y "buenos" congeladores, colaborando a elegir manejos adecuados para mejorar los resultados obtenidos del semen criopreservado (Yeste y cols., 2014). No obstante, verracos normoespérmicos podrían presentar temporalmente alto valor de fragmentación de ADN, lo cual no impactaría muy severamente el resultado reproductivo del verraco durante su vida (Waberski y cols., 2011). Por consiguiente, parece que un solo análisis no sería suficiente

como para decidir sobre el destino del reproductor.

Hay dos estrategias para implementar los análisis de cromatina espermática en la producción de dosis de IA en la especie porcina. Una podría ser el establecimiento de vigilancia periódica, tratando de detectar verracos problemáticos puntuales, con un seguimiento para determinar si la alteración sería permanente o puntual). Esto requeriría de mínimos cambios en los centros ya que sólo tendrían que tomar algunas muestras espermáticas de vez en cuando a laboratorios especializados. La información así obtenida ayudaría en la gestión de calidad del centro de inseminación, aunque los resultados sólo reflejarían momentáneamente el estado de la población sesgada-

mente, perdiendo la capacidad de adelantarse o reaccionar con rapidez ante un problema de fragmentación.

La otra estrategia es la implementación completa del análisis de la integridad de la cromatina espermática en el flujo de trabajo del centro, testando todos los eyaculados inmediatamente. Esto permitiría un control de calidad en continuo, una vigilancia sanitaria a tiempo real, y la eliminación práctica de cualquier muestra de baja calidad. Sin embargo, la inclusión de estas técnicas requieren de procesamiento durante la producción de dosis seminales, y consumen bastante tiempo (SCD, mediante microscopía, algo menos de 1h; SCSA mediante citometría, algo menos de 10 min). El análisis mediante microscopía requiere más tiempo pero a un coste menor, mientras que la citometría de flujo exige una inversión significativa inicial. No obstante, la citometría de flujo permite el análisis de una grandísima cantidad de células (miles) en pocos segundos. Hay algunas marcas comerciales que ya desarrollan y comercializan citómetros muy pequeños y manejables, convenientes para espacios limitados en laboratorios, por debajo de 20,000€.

## AGRADECIMIENTOS

El autor quiera expresar su agradecimiento a AIM Ibérica su soporte y contribución.

## PARA SABER MÁS

**EVENSON DP, THOMPSON L, JOST L.** Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*. 1994 Feb 2;41(3):637-51.

**BOE-HANSEN GB, CHRISTENSEN P, VIBJERG D, NIELSEN MB, HEDEBOE AM.** Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*. 2008 Apr 1;69(6):728-36. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.12.004. Epub 2008 Feb 19.

**DIDION BA, KASPERSON KM, WIXON RL, EVENSON DP.** Boar fertility and sperm chromatin structure status: a retrospective report. *J Androl*. 2009 Nov-Dec;30(6):655-60. doi: 10.2164/jandrol.108.006254. Epub 2009 May 28.

**BROEKHUIJSE ML, ŠOSTARIĆ E, FEITSMA H, GADELLA BM.** Relationship of flow cytometric sperm integrity assessments with boar fertility performance under optimized field conditions. *J Anim Sci*. 2012 Dec;90(12):4327-36. doi: 10.2527/jas.2012-5040.

**HERNANDEZ M, ROCA J, BALLESTER J, VAZQUEZ JM, MARTINEZ EA, JOHANNISSON A, SARAVIA F, RODRIGUEZ-MARTINEZ H.** Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *Int J Androl*. 2006 Dec;29(6):583-91.

**BENZONI E, MINERVINI F, GIANNOCCARO A, FORNELLI F, VIGO D, VISCONTI A.** Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reprod Toxicol*. 2008 Aug;25(4):461-7. doi:10.1016/j.reprotox.2008.04.001. Epub 2008 May 3.

**TSAKMAKIDIS IA, KHALIFA TA, BOSCOS CM.** Age-related changes in quality and fertility of porcine semen. *Biol Res*. 2012;45(4):381-6. doi: 10.4067/S0716-97602012000400009.

**THERIOGENOLOGY. 2011 JAN 15;75(2):337-45.** doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.09.004. Epub 2010 Oct 18.

**WABERSKI D1, SCHAPMANN E, HENNING H, RIESENBECK A, BRANDT H.** Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology*. 2011 Jan 15;75(2):337-45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.09.004. Epub 2010 Oct 18.

**GOSALVEZ J, LOPEZ-FERNANDEZ C, FERNANDEZ JL, GOURAUD A, HOLT WV.** Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev*. 2011 Dec;78(12):951-61. doi: 10.1002/mrd.21394. Epub 2011 Sep 14.

**YESTE M, ESTRADA E, CASAS J, BONET S, RODRIGUEZ-GIL JE.** Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*. 2013 Apr 1;79(6):929-39. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.01.008. Epub 2013 Feb 8.

**YESTE M, ESTRADA E, PINART E, BONET S, MIRO J, RODRIGUEZ-GIL JE.** The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*. 2014 Apr;68(2):251-61. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.004. Epub 2014 Feb 14.