

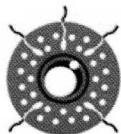


**UBA**  
Universidad de Buenos Aires

**SUPLEMENTO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Chorroarín 280 (C1427CWO) Bs. As., Argentina. Tel.(54 11) 4524 8400.

www.fvet.uba.ar



**INITRA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
Y TECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL  
Facultad de Ciencias Veterinarias UBA

**EVALUACIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA  
MEDIANTE LA TINCIÓN DE AZUL DE TOLUIDINA**

Carretero, María Ignacia<sup>(1,2)</sup>; Monachesi, Norma<sup>(1)</sup>; Allera, Cecilia<sup>(1)</sup>; Arraztoa, Cecilia<sup>(1)</sup>; Chaves María Graciela<sup>(1)</sup> y Neild, Deborah<sup>(1)</sup>

La incorporación de técnicas de reproducción asistida como la fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection) ha generado un mayor interés en la evaluación del ADN espermático. Esto se debe, principalmente, a que en la ICSI el espermatozoide no requiere estar vivo y/o moverse, pero necesita que su cromatina se encuentre intacta. Los espermatozoides con ADN dañado son capaces de fertilizar y transmitir material genético defectuoso que podría tener consecuencias adversas en el desarrollo embrionario<sup>(2)</sup>. Los espermatozoides son incapaces de reparar el ADN dañado porque no contienen enzimas funcionales de reparación<sup>(15)</sup> y aunque después de la fertilización, el ovocito pueda reparar un cierto nivel del ADN dañado<sup>(18)</sup>, esto puede resultar en un pobre o defectuoso desarrollo embrionario y en pérdidas embrionarias tempranas<sup>(1)</sup>. Por esto, sería beneficioso incorporar técnicas de evaluación del ADN espermático al espermograma de rutina, colaborando en una mejor estimación de la capacidad fecundante de un macho reproductor.

Se han utilizado varias técnicas para estudiar los defectos del ADN espermático, sin embargo, la mayoría de ellas son laboriosas

y costosas debido a que requieren equipamiento complejo y/o la utilización de kits, a veces no disponibles comercialmente en nuestro país. La tinción con Azul de Toluidina (AT) es bastante simple y permite evaluar el grado de condensación o compactación de la cromatina espermática. Es un colorante nuclear catiónico que al unirse al ADN de espermatozoides con cromatina descondensada, da lugar al color metacromático azul-violeta. Esto se debe a la formación de agregados de AT interactuando iónicamente con los fosfatos negativos de los nucleótidos. La coloración celeste (ortocromática) que se observa en espermatozoides con cromatina condensada, se debe a la participación de un número mucho más reducido de moléculas de AT que se unen como monómeros al ADN, mediante intercalación o por unión iónica<sup>(10)</sup>. La completa neutralización de los grupos fosfato por las argininas de las protaminas<sup>(21)</sup> y la ocurrencia de entrecruzamientos entre protaminas<sup>(5)</sup> son los principales factores responsables de la reducida afinidad de la cromatina compacta del espermatozoide maduro por los colorantes catiónicos. La tinción de AT es sencilla, sólo requiere un microscopio óptico y ha sido utilizada en varias especies. Una ventaja de esta técnica radica en que se pue-

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

2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. ignaciacarretero@gmail.com

den utilizar agentes reductores de los grupos disulfuro de las protaminas como el ditiotreitól (DTT) o el mercaptoetanol (ME), como controles positivos de la tinción con AT. Esto se debe a que estos compuestos permiten que las proteínas se relajen y que los grupos fosfato del ADN queden disponibles y accesibles a la unión del colorante <sup>(6, 10, 11, 12)</sup>.

En la técnica original se emplea una hidrólisis ácida previa a la tinción, con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la misma <sup>(7, 9, 16, 17, 23)</sup>. Estos autores observaron que los espermatozoides que tienen una cromatina altamente compacta son apenas afectados por la hidrólisis ácida y en consecuencia manifiestan con intensidad la ortocromasia (coloración celeste). Por el contrario, en los espermatozoides con una cromatina descondensada, las protaminas pueden ser parcialmente extraídas por la hidrólisis ácida permitiendo que las moléculas de AT se unan a los grupos fosfato y se manifieste la metacromasia (coloración oscura).

## Nuestra experiencia

En nuestro laboratorio se pudo apreciar la diferente coloración de los núcleos espermá-

ticos sin recurrir a una hidrólisis ácida previa, en las especies en las que se adaptó la técnica: equino <sup>(13, 22)</sup>, camélidos sudamericanos <sup>(10, 11, 12)</sup>, canino <sup>(20)</sup>, felino <sup>(3)</sup> y porcino <sup>(4)</sup>. Evitar el paso de la hidrólisis ácida disminuye los tiempos de procesado y minimiza los costos.

La técnica presenta variaciones según la especie en la que se aplica. En humanos, bovinos y conejos diferentes autores han utilizado etanol:acetona <sup>(16, 23)</sup>, etanol-ácido acético <sup>(7, 9, 14)</sup> o metanol <sup>(6, 24)</sup> para fijar las muestras previo a la tinción con AT. Sin embargo, la preparación de estos fijadores es compleja e incluso algunos son tóxicos por inhalación <sup>(19)</sup>. En nuestro laboratorio resultó efectiva la fijación con etanol 96° durante 2 minutos, siendo un paso rápido, inocuo y de bajo costo <sup>(3, 4, 10, 11, 12, 13, 20, 22)</sup>.

Otro punto a adaptar según la especie es la concentración del colorante. En humanos se utiliza al 0,05 %; en el toro y conejo al 0,025 %; en equino y camélidos al 0,02 % mientras que, en porcinos, caninos y felinos se utiliza al 0,25 %. También, los tiempos de tinción varían según la especie, en general 5 a 15 minutos son efectivos, a excepción del porcino que requiere al menos 30 minutos <sup>(4)</sup>.



S.R.L.  
**PRODUCTOS**  
AGROGANADEROS



especialistas en  
REPRODUCCIÓN ANIMAL  
con más de 15 años de experiencia



30 años ayudando al cuidado  
de la salud animal!

**ECM** **CHISON** **BoviScan**  
Value Imaging

**Línea de Ecógrafos**  
Portátiles para Repro - OPU - Carne - Doppler Color



**PRODUCTOS AGROGANADEROS S.R.L.**

Tel/Fax: (011) 4983 2979 / Tel: (011) 4982 5411  
pagroganaderos@speedy.com.ar / www.pro-agroganaderos.com.ar

**GUZMAN SRL**

Tel: (011) 5263 2083 / www.facebook.com/guzman.srl  
ventas@guzmansrl.com.ar / www.guzmansrl.com.ar

Los patrones de coloración en camélidos sudamericanos, equinos, caninos y felinos, son: celeste (AT negativos, condensación normal de la cromatina), violeta claro (AT intermedios, algún grado de descondensación) y violeta - azul oscuro (AT positivos, alto grado de descondensación) (Figura 1). Tanto los espermatozoides AT positivos como los AT intermedios se consideran células con la condensación de la cromatina alterada (3, 10, 11, 12, 13, 22). En el cerdo, toro y conejo (4, 7, 8) se observaron dos patrones de coloración: celeste y violeta - azul oscuro.

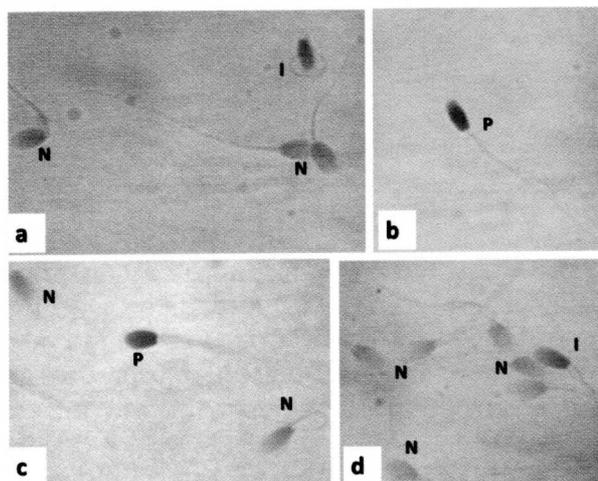
En todas las especies evaluadas en nuestro laboratorio, el DTT al 1% fue efectivo para inducir la descondensación de la cromatina. Con este agente, se observan diferentes patrones. En llama y guanaco se describen dos categorías principales: reaccionados y no reaccionados con el DTT (AT positivos y AT negativos, respectivamente). Dentro de los reaccionados se observan 3 subcategorías: I) cabezas muy descondensadas (muy agrandadas, con presencia de un gran número de vacuolas), II) cabezas deformadas (agrandadas, con un número moderado de vacuolas) y III) cabezas con mantenimiento de la forma. Las mismas categorías, aunque en diferente proporción, fueron observadas en el equino y felino (3, 22). En caninos, para lograr un alto grado de descondensación de la cromatina se requiere la adición

de un detergente como el dodecilsulfato sódico (SDS) que permite la entrada del DTT al núcleo espermático (20). Más aún, en el porcino el agregado del SDS permite observar espermatozoides AT positivos, pero no se observa un alto grado de descondensación de la cromatina (patrones I y II) (4). Estas diferencias entre especies podrían deberse a las diferentes tipos y proporciones de protaminas, e indican que la susceptibilidad a los agentes reductores varía entre especies y por lo tanto refuerza la necesidad de realizar la adaptación de la técnica a cada una.

*En conclusión, la tinción con AT permite evaluar el grado de condensación de la cromatina en espermatozoides de bovinos, conejos, camélidos, equinos, porcinos, felinos y caninos. La técnica desarrollada en nuestro laboratorio tiene las ventajas de evitar la hidrólisis ácida, utilizar un método sencillo y rápido de fijación y un tiempo de tinción relativamente corto. Además, es posible utilizar un control de descondensación de la cromatina que permite validar la técnica. Todas estas características hacen del AT una tinción sencilla y ágil que puede aplicarse en un espermograma de rutina en el trabajo a campo.*

## Referencias

- Ahmadi A, Ng SC. 1999. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp. Zool.* 284: 696-704.
- Aitken RJ, Krausz C. 2001. Oxidative stress DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497-506.
- Allera C, Comercio E, Gonzales Vera J, Miragaya M, Carretero MI. 2016. Evaluación del ADN espermático felino mediante la tinción de azul de toluidina. *In Vet* 18(1): 58.
- Arraztoa CC, Miragaya MH, Chaves MG, Trasorras MV, Gambarotta MC, Pendola CH, Neild DM. 2017. Porcine sperm vitrification I: cryoloops method. *Andrologia* 49: 12706. <https://doi.org/10.1111/and.12706>.
- Balhorn R. 1989. Mammalian protamines: Structure and molecular interactions. In: Adolph KW (Ed) *Molecular biology of chromosome function*. Springer, New York-Berlin-Heidelberg 366-395.
- Barrera C, Mazolli AB, Pelling C, Stockert C. 1993. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. *Acta histochem (Jena)* 94: 141-149.
- Beletti ME, Mello MLS. 1996. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. *Braz. J. Genet.* 19: 97-103.
- Beletti ME, Mello MLS. 2004. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology* 62: 398-402.



**Figura 1.** Espermatozoides de llama (a y b) y de equino (c y d) teñidos con azul de toluidina (AT). **N:** AT negativos (condensación normal de la cromatina), **I:** AT intermedios (algún grado de descondensación) y **P:** AT positivos (alto grado de descondensación). Imágenes obtenidas con un analizador de imágenes con una magnificación de 3016, 25x.

9. Beletti ME, da Fontoura Costa L, Mendes Guardieiro M. 2005. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. Morphol. Sci.* 22(2): 85-90.
10. Carretero MI, Giuliano SM, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM. 2009. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *InVet* 11(1): 55-63.
11. Carretero MI, Giuliano S, Agüero A, Pinto M, Miragaya M, Trasorras V, Egey J, von Thungen J, Neild D. 2010a. Guanaco sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. *Reprod. Fertil. Dev.* 22(1): 310-310.
12. Carretero MI, Arraztoa CC, Casaretto CI, Huanca W, Neild DM, Giuliano SM. 2010b. Alpaca sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. In: *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*. Lieke Boersma (Eds), Wageningen Academic Publisherspp. 141-144.
13. Carretero MI, Arraztoa CC, Ferrante A, Caldevilla M, Santa Cruz R, Neild D. 2012. Evaluation of stallion sperm DNA during cryopreservation using the Toluidine Blue stain and the Sperm Chromatin Dispersion test. *J. Equine Vet. Sci.* 32 (8): 480.
14. Dogan S, Vargovic P, Oliveira R, Belser L, Kaya A, Moura A, Sutovsky P, Parrish J, Topper E, Memili E. 2015. Sperm Protamine-Status Correlates to the Fertility of Breeding Bulls. *Biol. Reprod.* 92 (4): 1-9
15. Drost JB, Lee WR. 1995. Biological basis of germline mutation: comparisons of spontaneous germline mutation rates among *Drosophila*, mouse, and human. *Environ. Mol. Mutagen.* 25 (26): 48-64.
16. Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. 2004. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *H. Reprod.* 19 (10): 2277-2282.
17. Flores RB, Angrimani DSR, Rui BR, Brito MM, Abreu RA, Vannucchi CI. 2017. The influence of benign prostatic hyperplasia on sperm morphological features and sperm DNA integrity in dogs. *Reprod. Dom. Anim.* 52 (2): 310-315.
18. Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Ecozcue J. 1992. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum. Genet.* 89: 181-186.
19. Macedo JB, Nava Muñoz S. 2000. Intoxicación por metanol inhalado. *Rev. Asoc. Mex. Med. Crit y Ter Int.* 14(2): 67-70.
20. Monachesi NE, Carretero MI. 2016. Sperm Chromatin evaluation of raw dog semen using toluidine blue. *The 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. A Satellite Meeting to the International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*. June 26-30, Tours, France.
21. Pogany GC, Corzen M, Weston S, Balhorn R. 1981. DNA and protein content of mouse sperm. *Exp. Cell. Res.* 127-136.
22. Sardoy MC, Carretero MI, Neild D. 2008. Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. *Anim. Reprod. Sci.* 107: 349-350.
23. Tsarev I, Bungum M, Giwercman A, Erenpreisa J, Ebsen T, Ernst E, Erenpreiss J. 2009. Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin structure assessment. *Hum. Reprod.* 24 (7): 1569-1574.
24. AL, Cisale HO, Ferrari MR. 2008. Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. *Veterinary Record* 163: 625-629.



Ecógrafos Veterinarios

**Ecógrafos veterinarios HONDA - 100% Japanese**



### HONDA HS 102 V

**NUEVA PANTALLA**

- + 2.5 veces más brillo y contraste
- + Mayor calidad de imagen y definición



**MEDICIONES**

- + Grilla rápida
- + Cáliper



### HONDA HS 160 V

**NUEVA PANTALLA**

- + Brillo
- + Contraste
- + Ángulo de visión
- + Calidad de imagen



**ANGULO DE VISION 170°**



NUEVO CON COLOR

**MÚLTIPLES TRANSDUCTORES**

- + Calidad de carne
- + OPU





www.imgadvantage.com.ar - info@imgadvantage.com.ar - ecografoshonda@hotmail.com - 011 4751.5920