

Estudios preliminares del núcleo espermático de ciervo colorado (*Cervus elaphus*)

FERRARI, M.R.¹; GIULIANO, S.M.¹; SPIRITO, S.E.¹; RIVOLTA, M.A.^{1,2}; FERNÁNDEZ, H.A.¹

Resumen

En este trabajo se presentan el valor del contenido haploide de ADN, varias características de la distribución de la cromatina y algunas determinaciones morfométricas del núcleo espermático de ciervo colorado (*Cervus elaphus*). De acuerdo con nuestro conocimiento es la primera vez que se establece el contenido haploide de ADN en la especie. La Reacción de Feulgen se hizo sobre extendidos de semen obtenidos por electroeyaculación de un macho adulto. Se determinaron mediante microespectrofotometría de barrido y teniendo como patrón de referencia eritrocitos de pollo: el contenido medio haploide de ADN ($3,88 \pm 0,58$ pg), la relación absorbancia máxima/absorbancia media ($3,01 \pm 0,08$) y la absorbancia máxima, que se encontró en la base del núcleo espermático. Se hicieron determinaciones morfométricas sobre imágenes digitalizadas de núcleos espermáticos, también coloreados con la Reacción de Feulgen. Los siguientes caracteres se midieron sobre el plano principal: área ($26,12 \pm 0,20 \text{ } \mu\text{m}^2$), perímetro ($20,01 \pm 0,07 \text{ } \mu\text{m}$), diagonal máxima ($7,82 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{m}$), diagonal mínima ($4,25 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{m}$) y se establecieron las relaciones diagonal máxima/diagonal mínima ($1,85 \pm 0,01$) y forma ($0,81 \pm 0,01$). Tanto las mediciones de absorbancia como las determinaciones morfométricas mostraron coeficientes de variación bajos ($< 0,15$), lo que indicaría que las características nucleares analizadas tienen escasa variabilidad y que las técnicas empleadas tanto de coloración como de medición fueron precisas.

Palabras clave: (*Cervus elaphus*), (núcleo espermático), (contenido de ADN), (morfometría nuclear).

Red deer (*Cervus elaphus*) sperm nucleus preliminary studies.

Summary

In this work we measured the red deer (*Cervus elaphus*) haploide DNA content, several nuclear sperm morphometric characteristics and some chromatin distribution parameters. According to our knowledge, it is the first time that the DNA content was measured on this species. Feulgen Reaction, which is specific and stoichiometric for DNA, was carried out on semen smears obtained by electroeyaculación from an adult male. Using microspectrophotometry and *Gallus domesticus* as standard species, the haploid DNA content was determined (3.88 ± 0.58 pg). Chromatin distribution was evaluated using characteristics such as maximum and average absorbance and

¹Área Física Biológica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (1427). Buenos Aires, Argentina. E-mail: mferrari@fvet.uba.ar - ²Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires. República de la India 3000. (1425). Buenos Aires. Argentina.

Recibido: 20/06/08 - Aceptado: 03/12/08

their relationships. The first was observed in the nucleus basal zone and the value of the maximum/average absorbance was 3.01 ± 0.08 . Using digital microphotographs of normal sperm stained with Feulgen, the following characteristics were measured on the main plane: area ($26.12 \pm 0.20 \mu\text{m}^2$), perimeter ($20.01 \pm 0.07 \mu\text{m}$), maximum diagonal ($7.82 \pm 0.03 \mu\text{m}$), minimum diagonal ($4.25 \pm 0.03 \mu\text{m}$) and were obtained two indirect diagonal maximum diagonal/minimum diagonal (1.85 ± 0.01) and shape (0.81 ± 0.01). The absorbance measures and the morphometric determinations showed low coefficients of variation (< 0.15). These results suggest that the nuclear characteristics may have little variability and that the stain and measurement techniques are accurate.

Key words: (*Cervus elaphus*), (sperm nucleus), (DNA content), (nuclear morphology)

Introducción

La ganadería de ciervos colorados (*Cervus elaphus*) es una producción diversificada en la que se obtiene carne, velvet, cueros y reproductores. Además, permite la realización de actividades tales como caza y desarrollo de safaris²⁴.

Para obtener mayor producción en los rodeos y mejorar el acervo genético de los reproductores es necesario optimizar las técnicas reproductivas. Con este fin, distintos autores han realizado estudios en semen de la especie^{2, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 22, 26, 30}.

Dentro de las características seminales utilizadas para evaluar los eyaculados en diferentes especies se encuentra la morfología de la cabeza y del núcleo espermático. Ambos parámetros están relacionados con el contenido y la calidad de la cromatina espermática^{6, 12, 23, 25, 27, 29}. En ciervos colorados se realizaron estudios morfométricos de la cabeza espermática que permitieron discriminar entre poblaciones que diferían en su respuesta al congelamiento⁷. Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, no hay estudios sobre la morfometría del núcleo espermático y la distribución de la cromatina en el ciervo colorado. Por otra parte, la consulta de la base de datos Animal Size Data, que reúne publicaciones Internacionales de los últimos 50 años sobre determinaciones del contenido de ADN (C-DNA), permitió confirmar la falta de datos acerca del valor del contenido de ADN en *Cervus elaphus*^{16,17}. La determina-

ción del contenido de ADN es un parámetro valioso para realizar estudios evolutivos y de biodiversidad, así como para estimar en forma directa los costos en programas de secuenciación de ADN¹⁸.

Los objetivos del presente trabajo fueron obtener valores preliminares del contenido de ADN y de parámetros de la distribución de la cromatina y de la morfometría de núcleos espermáticos normales en ciervo colorado.

Materiales y métodos

Material

La muestra de semen se obtuvo por electroeyaculación usando un electroeyaculador PT-Electronic, de un ejemplar de fertilidad comprobada estando el animal sedado con xilazina (4mg/kg).

Reacción de Feulgen

Esta reacción se realizó sobre 2 extendidos de semen fresco procesados simultáneamente en caja de Coplin¹¹. La fijación se hizo en etanol-ácido acético glacial (3:1, v/v) durante 30 minutos y luego se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno en agua destilada. Posteriormente los preparados se hidrolizaron durante 40 minutos en HCl 5N a 22° C, se hicieron tres lavados durante 10 minutos cada uno en agua destilada y se colorearon con el

reactivo de Schiff's (pH 2,2) durante 60 minutos (5° C y oscuridad). El material coloreado se lavó tres veces durante 10 minutos cada vez en agua sulfurosa (180 ml de agua destilada, 10 ml bisulfito de sodio al 10 % y 10 ml HCl 1N). Los lavados se hicieron a 5° C y en oscuridad.

Preparación del Colorante: 0,7 gr. de Fucsina Básica (Merck®), 3,8 gr de metasulfito de sodio, 200 ml de ácido clorhídrico 0,15 Normal, 1 gr de carbón activado (o más). Se disuelve el metabisulfito de sodio en ácido clorhídrico, se agrega Fucsina Básica y se agita durante 2 horas en agitador magnético y en oscuridad. Se agrega carbón activado y se filtra. Si no está claro se agrega más carbón activado y se vuelve a filtrar. Guardar en heladera, en oscuridad, y en frasco color caramelo.

Citometría del complejo Feulgen-ADN

Los portaobjetos tenían dos extendidos, uno que correspondía a la muestra de semen y el otro a la de eritrocitos de pollo. Los núcleos diploides de estos últimos no se dividen y tienen un contenido de ADN estable (*Gallus domesticus*, contenido haploide, C-DNA=1,25 pg)¹⁷ y se utilizaron como control para la medición del contenido de ADN en los espermatozoides haploides de ciervo colorado.

La medición del complejo Feulgen-ADN se hizo en un microespectrofotómetro de barrido Cytoscan Zeiss Universal (UMSP 30) bajo un objetivo 100x y luz de longitud de onda correspondiente a 560 nm. El equipo realiza, sobre cada núcleo espermático, un barrido xy (con paso de 0,25 µm) obteniendo valores de absorbancia. La absorbancia (log [intensidad de la luz incidente/intensidad de la luz transmitida]) es directamente proporcional a la cantidad de complejo Feulgen-ADN presente. Como la reacción de Feulgen es específica y estequiométrica del ADN, la absorbancia es directamente proporcional al contenido de ADN. Se tomó como blanco (absorbancia=0) puntos externos a los espermatozoides.

Las mediciones se hicieron sobre 30 núcleos espermáticos individuales y normales, considerando como tales aquellos que presentaban la morfología más numerosa y homogénea en la población. Todas las mediciones fueron hechas por el mismo operador.

Los parámetros que se determinaron fueron los siguientes: el área del plano principal (A), la absorbancia media (AbM_{ed}), que corresponde a la sumatoria de todas las absorbancias medidas sobre un núcleo espermático divididas por el número total de puntos medidos, la absorbancia máxima (AbM_{ax}) que indica el punto del espermatozoide donde el contenido de ADN es máximo y el producto (AbM_{ed})x(A) que equivale al contenido de ADN expresado en unidades arbitrarias. La comparación de este último valor con el valor promedio obtenido en el control (eritrocitos de pollo) permitió expresar el contenido haploide de ADN (C-DNA) de cada núcleo en pg. En cada portaobjeto se midieron números similares de núcleos espermáticos de ciervo colorado y eritrocitos de pollo totalizando 60 núcleos (30 de cada especie).

Morfometría de núcleos espermáticos normales

En el plano principal de 75 núcleos espermáticos normales, coloreados con la reacción de Feulgen, se determinaron seis parámetros morfológicos usando un analizador de imágenes (Kontron Bildanalyse, MiniMOP). Cuatro de ellos son básicos: área del plano principal (A), perímetro (P), diagonal máxima (DM_{ax}) y diagonal mínima (DM_{in}) del plano principal y dos derivados de los anteriores que son estimadores de la forma: diagonal máxima/diagonal mínima (DM_{ax}/DM_{in}) y forma ($4\sqrt{\text{área/perímetro}^2}$). Para una figura circular el valor de la forma es igual a 1 y este valor disminuye a medida que la figura se elonga.

Estadística: los resultados obtenidos se analizaron con estadística descriptiva.

Resultados

La Figura 1 muestra la imagen microscópica de núcleos espermáticos normales del ciervo colorado estudiado, coloreados con la Reacción de Feulgen.

En la Tabla 1 se presentan los valores (AbM_{ax}), (AbM_{ed}), (AbM_{ax}/AbM_{ed}) y (C-DNA) determinados mediante microespectrofotometría de barrido en 30 núcleos espermáticos normales y coloreados con la Reacción de Feulgen. Todas las variables tuvieron un coeficiente de variación menor a 0,15.

La Figura 2 representa las curvas que unen puntos de igual absorbancia. La máxima absorbancia se encuentra en la base del núcleo, en la zona de inserción de la cola, y las curvas indican un decaimiento del contenido de ADN hacia los bordes del espermatozoide, mostrando una distribución anisótropa.

En la Tabla 2 se presentan los valores medio, máximo y mínimo de seis parámetros morfométricos, cuatro básicos, (A), (P), (DM_{ax}), (DM_{in}) y dos derivados de los anteriores, (DM_{ax}/DM_{in}) y ($4\delta\text{área}/\text{perímetro}^2$). Las mediciones se hicieron sobre el plano principal de 75 núcleos normales. Los parámetros morfométricos presentaron un coeficiente de variación que osciló entre 0,03 y 0,07.

Discusión y conclusiones

Las determinaciones presentadas en este trabajo se hicieron sobre núcleos espermáticos normales de un ciervo colorado, teñidos con la Reacción de Feulgen. Esta reacción, que es específica y estequiométrica con el ADN, se aplicó bajo condiciones similares a las descriptas para bovinos¹¹ y permitió realizar observaciones microscópicas precisas de la morfología nuclear. El valor C-DNA ($3,88 \pm 0,05$ pg) que se obtuvo es similar al medido en otras especies de la familia Cervidae y en otros mamíferos superiores^{1, 16, 17, 18, 20}. Dado que las variaciones en el contenido de ADN son infrecuentes entre individuos de la misma especie¹⁹ y que aún en un mismo individuo espermatozoides con morfologías nuclea-

res normales y anormales no presentan diferencias significativas¹², el resultado obtenido en el presente trabajo podrá ser útil en investigaciones futuras.

El valor de la relación (AbM_{ax}/AbM_{ed}) es indicativo de la forma en que está distribuida la cromatina espermática; cuanto menor es el valor de esta relación, sería más homogénea la distribución de la cromatina. En el presente trabajo la relación (AbM_{ax}/AbM_{ed}) mostraría que la cromatina espermática del ciervo colorado estudiado tendría una distribución similar a la observada en bovinos, ovinos, muflones y cerdos y que se alejaría de la que presentan equinos y llamas^{14, 27}.

El análisis de la morfología espermática es un indicador importante para la estimación de fertilidad³ y las técnicas computacionales permiten evaluaciones objetivas y repetibles de la morfología^{7, 8, 15}. En el presente trabajo las determinaciones morfométricas permitieron estimar la forma del núcleo espermático a través de las relaciones $4\delta\text{área}/\text{perímetro}^2$ y DM_{ax}/DM_{in} . El valor de este último parámetro fue 1,85 y resultó similar al obtenido para la cabeza espermática por otros autores⁷. Esta semejanza corrobora lo que han señalado diversos trabajos, que tanto la morfología del núcleo como la de la cabeza espermática están condicionadas por el contenido de ADN y la organización de la cromatina^{5, 12, 21, 23}. Por otra parte, los valores de A ($26,12 \pm m^2$) y DM_{ax} ($7,82 \pm m$) del núcleo espermático obtenidos en el presente trabajo son levemente menores que los medidos por otros autores en la cabeza espermática ($32,56 \pm m^2$ y $8,53 \pm m$ respectivamente)⁸. Esto puede ser una consecuencia de que la mayor parte de la cabeza está ocupada por el núcleo²⁸.

La comparación del valor del área del plano principal del núcleo espermático entre espermatozoides que tienen un contenido de ADN similar sería un indicador de la compactación y/o distribución de la cromatina. Cuanto mayor es el área del plano principal, menor sería la compactación de la cromatina o su distribución sería diferente. Los valores

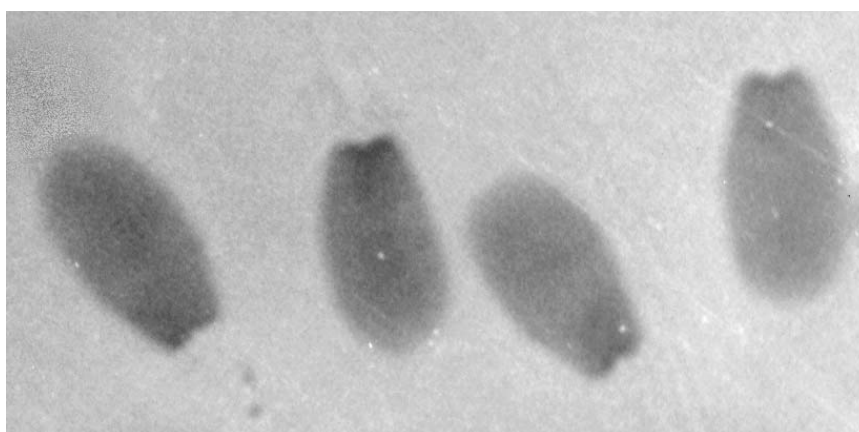


Figura 1. Núcleos espermáticos de *Cervus elaphus* con morfología normal y coloreados con la Reacción de Feulgen. (Aumento ca 2000).

Tabla 1. Contenido de ADN y parámetros característicos de la distribución de la cromatina en núcleos espermáticos normales de un ciervo colorado. Los núcleos (n=30) fueron coloreados con la Reacción de Feulgen y medidos mediante microespectrofotometría de barrido (560 nm).

Característica	Media \pm ES	Valor Máximo	Valor Mínimo	Coefficiente de Variación
AbM _{ax}	0,37 \pm 0,01	0,49	0,31	0,15
AbM _{ed}	0,12 \pm 0,00	0,15	0,10	0,01
AbM _{ax} / AbM _{ed}	3,01 \pm 0,08	4,50	2,33	0,15
C-DNA (pg)	3,88 \pm 0,05	4,34	3,44	0,07

obtenidos en el presente trabajo indicarían que el ciervo colorado estudiado presenta mayor similitud en este aspecto con bovinos, ovinos, muflones y cerdos que con equinos y llamas^{14, 27}.

En este trabajo se obtuvo por primera vez, de acuerdo a nuestro conocimiento, el valor del contenido de ADN haploide en la especie *Cervus*

elaphus. Se presentaron valores promedios de características de la distribución de la cromatina y parámetros morfométricos del núcleo espermático. Estos resultados podrían enriquecer estudios evolutivos y de biodiversidad, así como contribuir a mejorar las técnicas de evaluación de la calidad seminal en la especie. Por

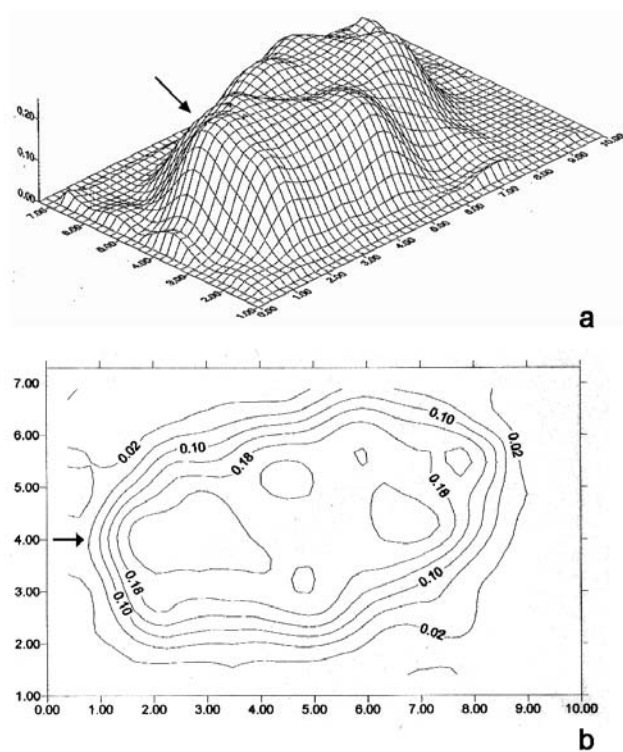


Figura 2. Representación del contenido de ADN de núcleos espermáticos de *Cervus elaphus*. a) \bar{x} e \bar{y} corresponden a los ejes de plano principal (μm) y \bar{z} a la absorbancia. b) \bar{x} e \bar{y} corresponden a los ejes de plano principal (μm) las curvas de nivel unen puntos de igual absorbancia. La flecha indica la zona de inserción de la cola.

Tabla 2. Determinaciones morfométricas hechas en núcleos espermáticos de ciervo colorado coloreados con la Reacción de Feulgen (n=75)

Característica	Media+ES	Valor Máximo	Valor Mínimo	Coefficiente de Variación
A (μm^2)	26,12±0,20	31,39	22,90	0,07
PE μm	20,01±0,07	22,03	18,14	0,03
DM _{áx} (μm)	7,82±0,03	5,58	4,60	0,03
DM _m (μm)	4,25±0,03	3,26	2,42	0,05
DM _{áx} / DM _m	1,85±0,01	2,15	1,63	0,06
(4πA/Pe ²)	0,81±0,00	0,87	0,73	0,04

otra parte, las metodologías utilizadas mostraron ser adecuadas para el análisis del núcleo espermático de ciervo colorado.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Criadero de Fauna Silvestre ALGAR SA el material que brindó y al Proyecto ARCA (Asistencia a la Reproducción y Conservación Animal) del Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires la obtención de la muestra de semen. Así mismo, agradecen al Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (FCAF, UNLP) y ex Centro de Investigaciones Genéticas (UNLP-CONICET-CIC) el uso del microespectrofotómetro de barrido Cytoscan Zeiss Universal (UMSP 30) y el analizador de imágenes (Kontron Bildanalyse, MiniMOP).

Bibliografía

1. Atkin, N.B.; Mattinson, G.; Beçak, W.; Ohno, S. The comparative DNA content of 19 species of placental mammals, reptile, and birds. *Chromosoma* 1965; 17:1-10.
2. Berg, D.K.; Asher, G.W. New developments reproductive technologies in deer. *Theriogenology* 2003; 59:189-205.
3. Chemes, E.H.; Rave, Y.W. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod* 2003;9:405-428.
4. Comizzoli, P.; Mauget, R.; Mermillod, P. Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* 2001; 56:261-274.
5. Eggert-Kruse, W.; Reimann-Andersen, J.; Rohr, G.; Poh, L.S.; Tilgen, W.; Runnebaum, B. Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm-mucus interaction in vivo and in vitro. *Fertil Steril* 1995; 63:612-624.
6. Erenpreisa, J.; Freivalds, T.; Slaidina, M. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry* 2003; 52:19-27.
7. Estes, M.C.; Soler, A.J.; Fernández-Santos, M.R.; Quintero-Moreno, A.A.; Garde, J.J. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J Androl* 2006; 27:662-670.
8. Estes, M.C.; Fernández-Santos, M.R.; Soler, A.J.; Montoro, V.; Quintero-Moreno, A.; Garde, J.J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. *Reprod Domest Anim* 2006; 41:241-246.
9. Fernández-Santos, M.R.; Martínez-Pastor, F.; García-Macias, V. et al. Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *J Androl* 2007; 28:294-305.
10. Fernández-Santos, M.R.; Estes, M.C.; Soler, A.J.; Montoro, V.; Garde, J.J. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2006; 41:114-118.
11. Ferrari, M.R.; Spirito, S.E.; Giuliano, S.M. Feulgen reaction: its microspectrophotometric analysis in bovine spermatozoa. *Com Biol* 1996; 14(1): 19-32.
12. Ferrari, M.R.; Spirito, S.E.; Giuliano, S.M.; Fernández, H.A. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. *Andrologia* 1998; 30:85-89.
13. Garde, J.J.; Ortiz, N.; García, A.J.; Gallego, L.; Landete-Castillejos, T.; López, A. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch Androl* 1998; 41:195-202.
14. Giuliano, S.M.; Ferrari, M.R.; Spirito, S.E.; Roldán, J.; Fernández, H.A. Contenido de ADN de llama (*Lama glama*) y estudio de la distribución de la cromatina espermática. [Resumo ASI 047]. II Congreso de Medicina Veterinária do Cone Sul, XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária e XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (COMBRAVET) 1997, Gramado, Brasil.
15. Gravance, C.G.; Champion, Z.; Liu, I.K.M.; Casey, P.J. Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Anim Reprod Sci* 1997;47:149-155.
16. Gregory, T.R. Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. *Genome* 2000; 43:895-990.

17. Gregory, T.R. Animal Genome Size Database. *En: <http://www.genomesize.com>*, consultado el 18 de agosto de 2007.
18. Gregory, T.R.; Nicol, J.A.; Tamn, H. et al. Eukaryotic genome size databases 2007. *Nucleic Acids Res.* 35:D332-D338.
19. Krishan, A.; Dandekar, P.; Nathan, N.; Hamelik, R.; Miller, C.; Shaw, J. *DNA index, genome size, and electronic nuclear volume of vertebrates from the Miami Metro Zoo Cytometry* 2005; 65:26-34.
20. Lewin, B. 1980. *Gene Expression*. 2nd Edition. Editorial John Wiley & Sons, New York, USA pág. 958-964.
21. Liu, D.Y.; Baker, H.W. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril* 1992; 58:1178-1184.
22. Martínez-Pastor, F.; García-Macias, V.; Alvarez, M. et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 2006; 65:471-485.
23. Ostermeier, G.C.; Sargeant, G.A.; Yandell, B.S.; Evenson, D.P.; Parrish, J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J Androl* 2001;72:595-603.
24. Pordomingo, A.J. 2001. Ganadería de Ciervo Colorado. *En: <http://www.produccionbovina.com.ar>*. Consultado el 28 de mayo 2007.
25. Sailer, B.L.; Jost, L.K. Evenson DP. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 1996; 24:167-173.
26. Soler, A.J.; Esteso, M.C.; Fernández-Santos, M.R.; Garde, J.J. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 degrees C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 2005; 64:1503-1517.
27. Spirito S, Boquet M, Giuliano S et al. *Distribución de la cromatina y morfología nuclear en espermatozoides equinos normales*. *InVet* 2001; 3(1-2):19-28.
28. Steinholt, H.C.; Chandler, J.E.; Baron, R.A.; Adkinson, R.W. Chromosome and Sperm Size of Holstiens with and without Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *J Dairy Sci* 1994; 77:1239-1250.
29. Vieytes, A.L. Evaluación del Núcleo Espermático Criopreservado y su Capacidad Fertilizante. *Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA*. 2004.
30. Zomborszky, Z.; Zubor, T.; Toth, J.; Horn, P. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilization of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta Vet Hung* 1999; 47:263-270.