

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA
Y
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

Correlaciones entre la calidad seminal del semen sexado y la fertilidad del toro.

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR
Diana Isabel Sánchez Paniagua**

Tutor: Dr. Felipe Martínez Pastor

JUNIO 2013



D. Felipe Martínez Pastor, investigador “Ramón y Cajal” del Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal de la Universidad de León,

Informa:

Que D.^a Diana Sánchez Paniagua ha realizado bajo su supervisión el trabajo de fin de máster titulado “Correlaciones entre la calidad seminal del semen sexado y la fertilidad del toro”, y autoriza su presentación, dado que reúne las condiciones necesarias.

En León, a 7 de junio de 2013.

Fdo.: Felipe Martínez Pastor

Índice.

1. Introducción.....	1
1.1 Ventajas del uso de semen sexado.....	1
1.2 La técnica de sexado de espermatozoides: bases.....	2
1.3 La técnica de sexado de espermatozoides: efectos derivados.	6
1.4 Criopreservación espermática y <i>reverse sort technology</i>	11
1.5 Alternativas a la citometría de flujo.	13
1.6 El semen sexado en la gestión reproductiva del ganado bovino.	15
1.7 Estudios relacionados con la fertilidad.....	18
1.8 Fertilidad y análisis <i>in vitro</i>	23
1.9 Uso del semen sexado en transferencia embrionaria (TE).	26
1.10 Uso del semen sexado en fecundación <i>in vitro</i> (FIV).	29
1.11 Futuro del semen sexado.	31
2. Hipótesis y objetivos.	32
3. Materiales y metodologías.....	33
3.1 Reactivos y soluciones.....	33
3.2 Diseño experimental.	34
3.3 Sementales empleados.....	35
3.4 Recolección, valoración y sexado seminal.	36
3.5 Congelación, descongelación seminal y cálculo de la concentración espermática.	36
3.6 Inseminación artificial y obtención de datos de la fertilidad.....	37
3.7 Valoración de la motilidad espermática.	38
3.8 Análisis de las formas anormales.	39
3.9 Viabilidad y estado del acrosoma.....	39
3.10 Viabilidad y funcionalidad mitocondrial.....	41
3.11 Valoración de la estabilidad de la cromatina por el método SCSA.	42
3.12 Análisis de los datos.	44
4. Resultados.....	45
4.1 Valoración de la motilidad espermática.	45
4.2 Análisis de las formas anormales.	48
4.3 Viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad mitocondrial.	48
4.4 Valoración de la estabilidad de la cromatina por el método SCSA.....	50

5. Discusión.....	56
6. Conclusiones.....	60
7. Referencias bibliográficas.....	61
ANEXO I: Reactivos utilizados para la elaboración de soluciones y medios.....	68
ANEXO II: Resultados de los análisis mediante el sistema CASA.....	72
ANEXO III: Resultados de análisis de formas anormales.....	73
ANEXO IV: Resultados del análisis de viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad mitocondrial.....	74
ANEXO V: Resultados de los análisis mediante la técnica SCSA.....	75
ANEXO VI: Memoria de prácticas.....	76

Índice de abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALH: Amplitud del movimiento lateral de la cabeza del espermatozoide.

AuNP: Nanopartículas de oro.

BCL: Frecuencia de cruce de batido.

CASA: Computer-Assisted Sperm Analysis (Análisis computerizado de semen).

COMP: Cells Outside the Main Population.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole.

DFI: DNA Fragmentation Index.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FIV: Fecundación *in vitro*.

FSC: Forward-scattered light o dispersión frontal.

GnRH: Gonadoliberina: hormona liberadora de gonadotropinas.

hDFI: High DNA Fragmentation Index

HDS: High DNA Stainability.

IA: Inseminación artificial.

IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo.

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

IP: Yoduro de propidio.

ISAS: Integrated semen analysis system.

LIN: Índice de linealidad.

mDFI: Moderate DNA Fragmentation Index.

MOET: Multiovlación y trasplante de embriones.

PBS: Solución amortiguadora de sales de fosfato.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PHE: Epinefrina.

PNA: Aglutinina de *Arachis hipogaea*.

Psi: Pound-force per square inch.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay.

SD-DFI: Standart Desviation of the DFI.

SDF: Nivel basal de fragmentación en el ADN espermático.

SSC: Side-scattered light o dispersión lateral.

STR: Índice de rectitud.

tDFI: Total DNA fragmentation index.

TE: Transferencia embrionaria.

TNE: Tris/ NaCl/EDTA.

VAP: Trayectoria suavizada o media.

VSL: Velocidad según la trayectoria rectilínea.

xDFI: Mean DFI.

1. Introducción.

1.1 Ventajas del uso de semen sexado.

La posibilidad de escoger el sexo de la descendencia en actividades de transferencia embrionaria compensa la ligera reducción en los embriones viables. Incluso si un criador produce menos embriones totales, este aún está por delante con el número total de embriones específicos de un sexo determinado, y esto resulta en un aumento del valor por ternero. También es importante tener en cuenta que la posibilidad de reducir los costos de gestación del sexo no deseado puede ser significativo. Además, el solo hecho de gestar terneros del sexo deseado añade un importante valor a la técnica de sexado, ya que en muchas ocasiones los criadores se encuentran con limitaciones de recursos o receptoras. Se debe destacar que los embriones resultantes de transferencia se congelan bien, y cuando estos se combinan con semen sexado, pueden proporcionar más oportunidades de ventas nacionales, de exportación y de ingresos por embrión (Trans ova genetics, 2013).

La facilidad de partos difiere entre terneros machos y hembras, siendo mayor en estas últimas. Es por ello que, el semen sexado, tiene la gran ventaja de facilitar el parto en novillas, las cuales tienen unas mayores dificultades al mismo. Las terneras hembras, obtenidas a partir de dicho semen sexado, pesan menos al nacimiento en comparación con los machos. Incluso con el mismo peso al nacimiento, los porcentajes de distocias y de problemas puerperales asociados disminuyen (Garner y Seidel, 2008). El efecto derivado de las dificultades de parto depende del manejo y del semental (aptitud cárnica o láctea). Es importante el uso de sementales que presenten facilidades al parto (*Tabla 2*).

Cuando empleamos semen en el proceso de fecundación *in vitro* (FIV), debemos tener en cuenta que, aunque los gastos pueden ser ligeramente mayores, el número de embriones sexados producidos por procedimiento de aspiración de ovocitos puede ser mayor que el obtenido en transferencia, resultando en un menor gasto por embrión viable sexado. Otra ventaja es que una aspiración para FIV puede ocurrir cada dos semanas, hasta cuatro meses consecutivos, permitiendo, además, obtener ovocitos los primeros tres meses de gestación sin causar problemas (en transferencia embrionaria las hembras tienen dos ciclos pero luego tienen que estar en reposo tres meses antes de otra superovulación).

Tabla 2: Recopilación de las diferencias entre sementales de distinta raza, en cuanto a los diferentes caracteres productivos y reproductivos a tener en cuenta. *Modificado de EAAP publication "Cattle breeds in Ireland"*.

Raza semental	Dificultad de partos (%)	Duración gestación (días IA-parto)	Mortalidad (% a los 28 días)	Peso al destete (kg)	Peso de canal (kg)	Conformación (1-15 escala EUROP)
Holtein	6,1	281,9	3,3	-----	319,2 (778 d)	4,7
Blanco Azul Belga	9,6	283,7	2,7	301,8	319,2 (774 d)	7,8
Charolés	7,1	287,9	1,6	318,8	357,8 (707 d)	8,3
Limusín	5,1	289,5	1,7	290,2	333,6 (747 d)	7,5
Aberdeen Angus	5,2	283,1	3,4	258,1	301,4 (750 d)	5,9

El semen sexado antes de la congelación y después (*reverse sort*), funciona muy bien en un programa de FIV, de forma que los criadores pueden esperar un 95% ó mayor proporción de descendencia del sexo deseado mediante el empleo de semen sexado, previamente congelado, para su utilización en esta técnica. Es importante tener presente que los embriones fecundados *in vitro* no congelan tan bien como los embriones procedentes de transferencia embrionaria. Por ello se aconseja, para lograr unos mejores resultados, que los embriones fecundados *in vitro* con semen sexado se transfieran en fresco a las receptoras. Cuando se analiza el uso de la FIV y del semen sexado previamente congelado, los resultados son prácticamente los mismos que cuando se usa semen no sexado, aunque hay algunas desventajas en la utilización de semen sexado como el gasto de la compra de semen y el del procedimiento (Trans ova genetics, 2013).

1.2 La técnica de sexado de espermatozoides: bases.

La técnica de separación espermática está basada en la citometría de flujo, que es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y de fluorescencia que poseen las células.

En primer lugar se incuban los espermatozoides con un fluorocromo permeable que se une al ADN espermático (*Hoechst 33342*). Adicionalmente, se añade otro colorante, yoduro de propidio (PI) que permite determinar los espermatozoides muertos o dañados, y de esta manera separarlos de los espermatozoides sexados y viables. Para su análisis, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido y deben orientarse de forma que la cabeza espermática se sitúe en frente de un láser ultravioleta, para así medir cuantitativamente la cantidad de ADN contenido. En función de este contenido, los espermatozoides se cargan eléctricamente para después, pasar a través de un campo eléctrico (3000 W) que hace que las gotas se desvíen en función de su carga (ver esquema general: *Figura 3*). La fluorescencia que produce cada espermatozoide teñido es procesada por un *software* que permite al operador seleccionar las poblaciones espermáticas, según el sexo (*Figura 4*). Finalmente estos espermatozoides se clasifican en tres tubos colectores con medio, que contendrán a los espermatozoides portadores del cromosoma X (aproximadamente un 20%), portadores del cromosoma Y (20%), y a los clasificados como de desecho (no detectados por la técnica, muertos, etc.) que constituyen el 60% restante (Sharpe y Evans, 2009). El porcentaje más importante de los espermatozoides clasificados como de desecho lo constituyen aquellos orientados incorrectamente (30%) (Maxwell *et al.*, 2004).

Previamente al sexado, para controlar la calidad del semen, se descongela una pajuela por partida y se evalúa la motilidad progresiva (mínimo de un 35%) y la pureza o proporción de espermatozoides del sexo deseado (mínimo del 85%) (Sharpe y Evans, 2009).

Desde su introducción, la técnica ha sufrido varias modificaciones con el objetivo de incrementar la eficiencia y la pureza en la separación. En la *figura 5*, se muestra el impacto de la introducción de una modificación en la boquilla de separación (hacia una forma elíptica) que permite un mejor alineamiento de los espermatozoides durante el proceso, en lugar del sistema de aguja de inyección biselada tradicional, que empleaba un separador de boquilla no elíptico. En este último, las fuerzas hidrodinámicas que orientan el fluido son de menor duración y están más lejos del rayo láser (5,5 mm). El sistema que emplea una boquilla elíptica eleva, por tanto, el número de espermatozoides orientados (70% vs. 25%) que estarán disponibles para la clasificación. De esta forma, se consigue incrementar la velocidad y eficiencia de la técnica de sexado de espermatozoides. La introducción de separadores de alta velocidad también han

permitido mejorar los resultados (Sharpe y Evans, 2009. Johnson y Welch, 1999. Garner y Seidel, 2008).

Actualmente, gracias a todos los avances logrados y a la introducción de separadores electrónicos, se pueden clasificar hasta 8000 células por segundo bajo condiciones ideales, de forma que dos dosis convencionales de bovino para inseminación artificial, ó 14 dosis de 2,1 millones de espermatozoides, se pueden sexar en una hora (Sharpe y Evans, 2009; Rath *et al.*, 2013).

La eficiencia en el sistema de clasificación ha sido lograda mediante la identificación de espermatozoides muertos o dañados, de forma que únicamente los espermatozoides vivos e intactos son clasificados. Sin embargo, se sabe que estos últimos tienden a degenerar más rápidamente que los espermatozoides que no son sometidos a dicho sistema (en las especies bovina y porcina; aparentemente no en equinos ni ovinos) (Garner, 2006).

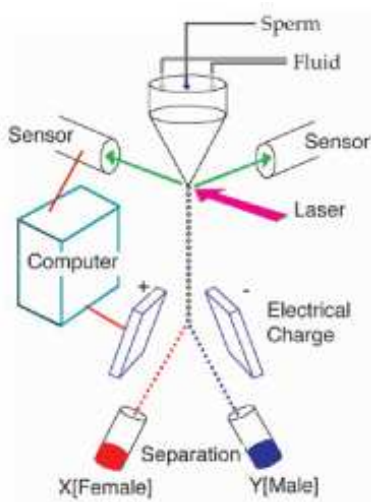


Figura 3: Citómetro de flujo. Esquema general. *Cogentuk.com*

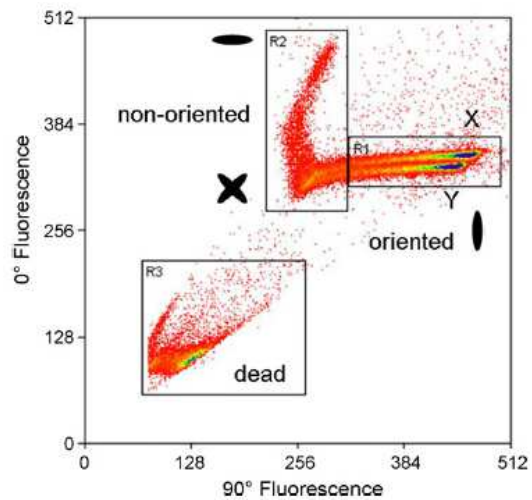


Figura 4: Histograma que recoge las distintas poblaciones espermáticas procesadas. *Sharpe y Evans, 2009.*

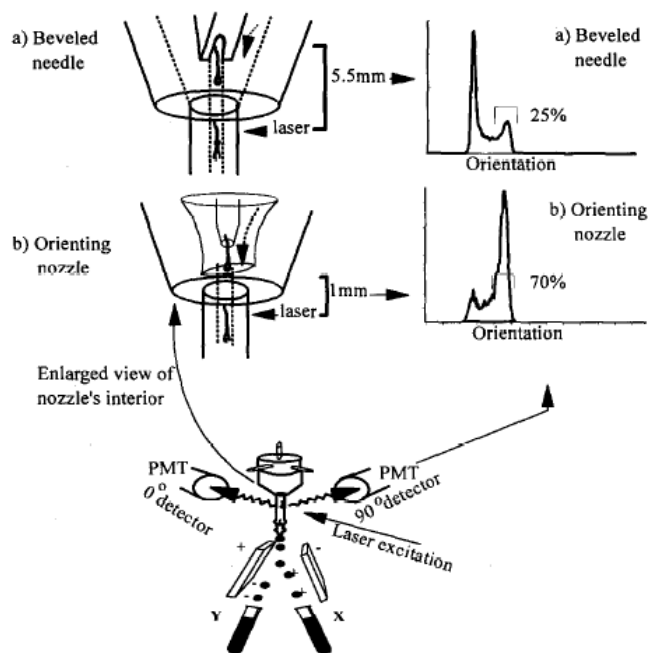


Figura 5: Johnson y Welch, 1999.

Diagrama esquemático de un separador celular representando los sistemas de orientación espermática: a) aguja de inyección biselada y b) boquilla elíptica, con sus correspondientes histogramas para la representación diferencial del número de espermatozoides orientados (%).

La única diferencia entre los espermatozoides portadores de un cromosoma X ó Y, es su cantidad de ADN, ya que los espermatozoides portadores del cromosoma X, tienen más contenido de material genético que los portadores del Y. No obstante, existen importantes diferencias entre ellos, en función de la especie, raza e individuo. En el verraco la diferencia en el contenido de ADN, es de un 3,6%; en el garañón, de un 3,7%; en el toro, de un 3,8% y en el carnero, de un 4,2%. A pesar de que el contenido en ADN de las células de cada especie de mamífero está altamente conservado, algunas diferencias en dicho contenido ocurren entre las diferentes razas bovinas. Este hecho se constata, también, entre razas europeas y asiáticas, cuyo tamaño de los cromosomas Y es diferente (Garner *et al.*, 1983).

En relación a las diferencias en el tamaño y la forma de la cabeza espermática, los espermatozoides de mamíferos con cabezas aplanadas y ovales, tienden a orientarse con menos dificultad a la hora del proceso de sexado. Además, existen diferencias entre especies a la susceptibilidad de tinción por el *Hoechst 33342*. Estas diferencias son

pequeñas, pero la alta resolución en la medida del contenido en ADN puede únicamente lograrse mediante la optimización del proceso de tinción para cada especie o, incluso, entre machos individuales dentro de una misma especie. También, deben tenerse en cuenta las susceptibilidades relativas de los espermatozoides a la exposición al láser, la alta dilución, la elevada presión y la resistencia a cambios en la composición de los medios. Esto hace del proceso de sexado un método diferente para cada especie de mamífero y, a menudo, para cada individuo dentro de una especie (Garner, 2006).

La reducción de la presión hidrostática permite reducir daños espermáticos y mejorar la fertilidad (Johnson y Welch, 1999). Es por ello que se ha llevado a cabo la reducción de la misma en el proceso de clasificación de los espermatozoides, pasando del empleo de 50 a 40 psi, no siendo factible una reducción mayor debido a que en especies productoras de espermatozoides con cabezas redondeadas o angulares, presiones inferiores a 40 psi pueden no ser suficientes para orientar los gametos en el citómetro (Garner, 2006).

1.3 La técnica de sexado de espermatozoides: efectos derivados.

Uno de los inconvenientes del uso de semen sexado es su disminuida eficacia, tanto *in vitro*, como *in vivo*, por los efectos perjudiciales derivados del proceso de sexado de los espermatozoides. Las alteraciones observadas están relacionadas con disminuciones en el porcentaje de mótiles o aumento de mótiles con motilidad no progresiva, incremento de membranas y acrosomas dañados, reducción del tiempo de vida, aceleración de la reacción acrosómica e incremento en los porcentajes de capacitación. En pequeños rumiantes, se ha descubierto que la clasificación por sexo no contribuye a la aceleración de la reacción acrosómica (Maxwell y Evans, 2006).

Las alteraciones anteriores, junto o con el reducido número de espermatozoides por pajuela (en torno a 2×10^6), en comparación con los $15-40 \times 10^6$ espermatozoides contenidos en una pajuela con semen convencional, pueden explicar el impacto negativo en la fertilidad cuando el semen sexado es utilizado para inseminación artificial o programas de multiovulación y transferencia de embriones (Trigal *et al.*, 2012).

Las limitaciones asociadas con la técnica de citometría de flujo para la clasificación de sexo (alto coste, falta de portabilidad y bajas porcentajes de procesamiento), han exigido la congelación de los espermatozoides antes de su uso.

Debido a que en el proceso de clasificación se somete a los espermatozoides a factores de estrés adicionales (químicos y físicos), incluyendo porcentajes de dilución elevadas, tiempo adicional *in vitro*, tinción del ADN, centrifugación, exposición a la luz ultravioleta, altas presiones del sistema y cargas eléctricas, el esperma necesita una protección especial para sobrevivir no sólo a la técnica de sexado, sino también al proceso de congelación-descongelación. No obstante, el éxito de estas técnicas, en forma de numerosas crías nacidas con salud y la capacidad reproductiva, proporciona confianza en los procedimientos de selección de sexo. Sin embargo, es necesario continuar con la investigación sobre los posibles efectos de los tratamientos del ADN espermático, ya que los porcentajes de pérdida de gestación precoz y tardía son elevados (Maxwell, 2006). El colorante *Hoechst 33342* parece no ser genotóxico, pero se sabe que es mutagénico en varios tipos celulares y que puede interferir en el desarrollo embrionario, aunque sus efectos sobre la descendencia se desconocen (Garner, 2009).

Se han publicado estudios que indican que no existen diferencias de motilidad o integridad del ADN (Sperm Chromatin Structure Assay) entre espermatozoides sometidos al proceso de sexado, con o sin tinción. Tampoco hay diferencias empleando diferentes concentraciones de colorante (*Hoechst 33342* a 149 μM ó 224 μM), en relación a la motilidad tras la separación y tras la descongelación. Los porcentajes de embriones divididos o blastocistos tras FIV, con y sin tinción, fueron similares (Maxwell *et al.*, 2004).

A pesar de estos resultados, la disminución de la esperanza de vida de los espermatozoides es uno de los principales problemas. Este hecho es provocado por la inmersión de los propios espermatozoides en la gota de carga del citómetro y la deflexión que sufren al ser separados y caer sobre la superficie plana en la que son acumulados. La tensión electrostática que se les aplica es similar a la utilizada en electroporación, y se forman transitoriamente poros en la membrana. Esto disminuye su capacidad fecundante en alrededor de un 30%. La exposición de los espermatozoides a un campo electrostático induce además la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En exceso, pueden afectar a la integridad de la cola, sobre todo a la zona de la pieza intermedia, donde se encuentran los mecanismos necesarios para proporcionar motilidad al espermatozoide. Esta alteración contribuye, por tanto, a la reducción de la motilidad del esperma, su viabilidad y su capacidad fecundante (Spinaci *et al.*, 2010. Rath *et al.*, 2013). El semen sexado exige, por tanto, una mejor detección del celo, para

ajustar el periodo de IA, asegurando una fecundación exitosa. Es importante indicar que diferentes eyaculados responden de forma diferente al estrés oxidativo y que el uso combinado de múltiples parámetros de calidad espermática, permiten mejorar la estimación de la fertilidad de un eyaculado (Fraser y Strzeżek, 2007).

Además del impacto del propio proceso de sexado sobre la calidad espermática, los pasos previos y posteriores a éste también influyen. La incubación con el colorante fluorescente a temperaturas ligeramente inferiores a la corporal, así como la conservación a bajas temperaturas hasta que tiene lugar la inseminación, son dos de los procesos más influyentes (Rath *et al.*, 2013).

Varios estudios han demostrado que el proceso de sexado del semen por la técnica de citometría de flujo puede promover alteraciones en la funcionalidad de la membrana, así como en las características de motilidad y morfología espermáticas (Mejía, 2010).

En relación a las morfoanomalías espermáticas, se han establecido numerosas clasificaciones, según la localización de la alteración (de cabeza, de cola o del tracto intermedio) o en función de la capacidad fecundante del espermatozoide anormal. Así, se clasifican en alteraciones mayores y menores, en función de si efecto deletéreo sobre la fertilidad es compensable mediante el incremento del número de espermatozoides en la dosis seminal. Según Mejía (2010), las alteraciones mayores no son afectadas por el proceso de sexado, ni por el tiempo de espera anterior al mismo, lo cual es cierto para las alteraciones menores. Teniendo en cuenta las anomalías morfológicas totales, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre semen sexado y no sexado. Sin embargo, cuando sumamos al proceso de sexado, 6 horas de tiempo de espera a temperatura ambiente de 21 °C (anterior a dicho proceso y tras la descongelación), sí se evidencian alteraciones, a pesar de que no se ven alterados los porcentajes de preñez.

La motilidad espermática es una de las principales características asociadas con la capacidad fecundante del semen. En un estudio realizado con el sistema CASA, y en el que fueron evaluados los parámetros de motilidad total (MT), progresiva (MP), velocidad según la trayectoria curvilínea o real (VCL), según la trayectoria suavizada o media (VAP), y según la trayectoria rectilínea (VSL), se evidenció un incremento en dichos parámetros cuando se empleó semen sexado, en comparación con los grupos de semen convencional. Esto lleva a la hipótesis de que el proceso de sexado reduce la población de células muertas y con lesión celular a través de su descarte (Mejía, 2010). Sin embargo, otros estudios como el de Carvalho *et al.*, (2009), evidencian que los

parámetros de motilidad y velocidad, nombrados en el estudio de Mejía (2010), y evaluados, también, por el sistema CASA, son superiores que el semen convencional.

En relación a la amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH), según el trabajo de Mejía (2010), el semen sexado presenta un valor superior, en comparación con el semen convencional. Además, el tiempo de incubación previo al sexado ejerce un efecto, ya que se observa un descenso de ALH conforme se incrementa dicho tiempo. Según Arruda (2000), un mayor valor de ALH, se traduce en una mayor calidad espermática (semen equino criopreservado). Auger et al. (1989), indica que el parámetro ALH, está citado en la literatura humana como un indicador de hiperactivación, característico de la capacitación espermática. Durante la capacitación, aumenta la ALH y, también, la VCL. sin embargo, la linealidad (LIN) se ve disminuida. Los parámetros evaluados en espermatozoides sexados por Mejía (2010), coinciden con un estado de hiperactivación espermática, la cual se sugiere que es desencadenada por el paso de los espermatozoides por el citómetro de flujo.

La criopreservación afecta a la pieza intermedia de los espermatozoides perjudicando, así, la producción de ATP para el movimiento flagelar y el valor de la frecuencia de cruce de batido (BCF).

El deterioro de la viabilidad (motilidad, función mitocondrial e integridad de la membrana plasmática) en espermatozoides descongelados ocurre paralelamente al incremento de inestabilidad de la cromatina y a la fragmentación del ADN. El semen sexado presenta un menor nivel inicial de fragmentación en el ADN, en comparación con el semen convencional. No obstante, el semen no sexado mantiene niveles bajos de fragmentación durante las primeras 48 horas de incubación, para después experimentar un ligero incremento, mientras que el semen descongelado sexado tiene una reducida longevidad del ADN. El daño del mismo ocurre entre las 24 y 48 horas, y a las 72 horas, es siete veces mayor que el daño que experimenta el semen convencional (Arruda *et al.*, 2012). La dinámica en la fragmentación del ADN no es la misma en todos los toros. Arruda *et al.*, 2012). Gosálvez et al. (2011) encontró que no todos los toros eran igualmente eficientes a la hora de lograr la reducción deseada en el nivel basal de daño en el ADN tras el proceso de separación espermática (Gosálvez *et al.*, 2011).

La integridad de la cromatina espermática es un importante factor que influye en la fecundación y el desarrollo embrionario (Fraser y Strzeżek, 2007). Otros estudios que el semen sexado criopreservado tiene una estructura de la cromatina menos homogénea

que el semen no sexado, incluso teniendo en cuenta que el proceso de sexado elimina las células no viables. Lo anterior sugiere que el proceso de sexado induce daños en la cromatina (Mocé *et al.*, 2006).

Como se ha citado anteriormente, la viabilidad e integridad de membrana de los espermatozoides bovinos, ovinos y porcinos se ve comprometida después de la técnica de la citometría de flujo. Sin embargo, hay estudios que indican que el proceso de clasificación de espermatozoides, en referencia al ADN espermático, no daña la cromatina espermática y, además, mejora la integridad del ADN mediante la eliminación de las células dañadas (Boe-Hansen *et al.*, 2005). Los cambios que se producen durante el sexado están probablemente relacionados con la hiperdilución y los cambios de presión y temperatura (los espermatozoides de verraco y carnero son menos susceptibles). Se ha demostrado que la incorporación de un citómetro de flujo de alta velocidad a presiones de entre 40 y 60 psi, no reduce la fertilidad *in vitro* y que, además, puede contrarrestar los efectos de la dilución a través de la reducción del tiempo de sexado y de un incremento en la concentración de espermatozoides en el medio de recogida (Maxwell y Johnson, 1999). Por el contrario, hay estudios que muestran que con presiones de 50 psi y superiores, los porcentajes de preñez disminuyen (Johnson and Welch, 1999. Schenk *et al.*, 2009). Además, se ha publicado que las altas presiones no solo afectan directamente al espermatozoide, sino también al desarrollo de embriones que resultan del empleo de semen sexado. Así, espermatozoides separados con presiones de 40 psi, generan embriones con un potencial de desarrollo significativamente superior al que resulta con la utilización de espermatozoides separados a 50 psi (Garner, 2009). Para minimizar los daños del proceso, una temperatura constante, buffers adecuados, pH óptimo y esterilidad del colorante y del medio de colecta y criopreservación, son esenciales (Maxwell *et al.*, 2004). Los efectos negativos también pueden verse reducidos mediante la incorporación de plasma seminal a los diluyentes empleados en el proceso de sexado. El nivel óptimo de plasma seminal, estudiado en porcino, para mejorar la viabilidad e integridad espermáticas es de un 10% (niveles de 5 ó 20% empeoran los parámetros anteriores). Además, este 10% parece ser beneficioso en términos de motilidad. Todavía no se conoce si en los espermatozoides bovinos tiene efectos beneficiosos similares.

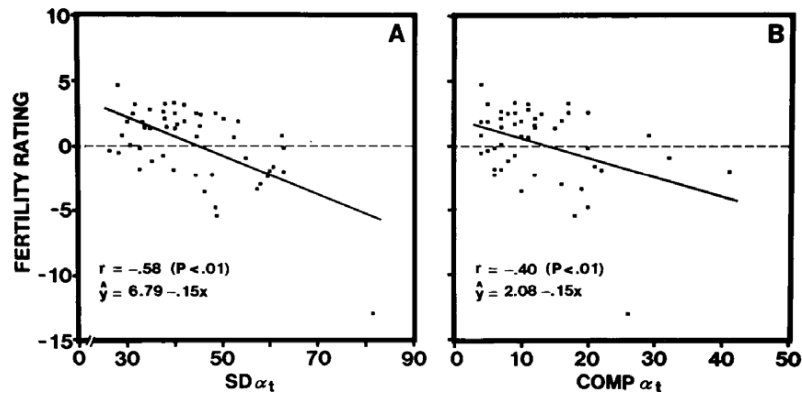


Figura 6. A: Relación entre la tasa de fertilidad y SD α_t (actualmente denominado SD-DFI). B: COMP α_t (células fuera de la población principal) en muestras de toro analizadas mediante SCSA (Ballachey et al., 1987). Al aumentar los valores de SD-DFI y COMP, disminuye la tasa de fertilidad de los toros.

Independientemente de la causa de la desestabilización de la cromatina, se ha comprobado que la estabilidad varía mucho entre diferentes muestras, y se ha asociado a una pérdida de fertilidad. El método SCSA es una herramienta muy valiosa para la evaluación del semen y para pronosticar la fertilidad de un toro e identificar a los machos con una fertilidad subóptima (Ballachey et al., 1987). El SD-DFI y el DFI (parámetros estimados por el método SCSA), están altamente correlacionados con la fertilidad. Además, un alto SD-DFI puede sugerir que existen daños en la cromatina de la población “normal” (Figura 6). En otros estudios se muestra que el DFI es la única variable que correlaciona con la fertilidad bovina (Boe-Hansen *et al.*, 2005).

1.4 Criopreservación espermática y *reverse sort technology*.

El éxito de la criopreservación del semen sexado, aunque evidencia un descenso en la fertilidad tras la descongelación en comparación con el semen convencional (Arruda *et al.*, 2012), es el principal factor que ha facilitado la comercialización de semen sexado de bovino. A pesar de que el semen sexado tiende a degenerar más rápido que el convencional, la criopreservación supera este problema permitiendo un almacenamiento indefinido, de forma que pueda ser transportado y usado en cualquier parte y en el momento requerido (Garner, 2006).

Las características *in vitro* del semen sexado congelado-descongelado, así como del semen re-criopreservado tras el sexado han sido analizadas y, a pesar de que el primero dispone de una mejor motilidad progresiva, integridad acrosomal, viabilidad de membrana, velocidad y actividad mitocondrial que el semen congelado-descongelado no sexado, la re-criopreservación tras el sexado deprime la mayoría de estas características, a excepción de la integridad y función mitocondriales (Underwood *et al.*, 2010). La motilidad en espermatozoides de toro y verraco tras los procesos de sexado y congelación-descongelación, disminuye más rápido que el semen sin sexar (en test de termorresistencia). en carnero y garañón, por el contrario, la motilidad se mantiene tras la incubación después del sexado (Maxwell *et al.*, 2004). La pobre fertilidad *in vivo* del semen congelado-descongelado puede ser debido a la combinación de su descenso de motilidad y parámetros de velocidad, reduciéndose así el número de espermatozoides viables presentes en el oviducto en el momento de la ovulación. Cabe citar que este tipo de semen es capaz de fecundar, tras dosis elevadas de inseminación, obteniéndose terneros sanos. Sin embargo, el semen re-criopreservado tras el sexado está capacitado prematuramente, por lo que se especula que la afinidad por la unión espermatozoide-células oviductales está significativamente reducida, afectando así a la fertilidad. La re-criopreservación exagera, por tanto, los efectos negativos del sexado en la calidad espermática, produciendo espermatozoides que tienen una reducida probabilidad de fecundar bajo condiciones normales de campo. Los embriones producidos *in vitro* pueden tener mejores opciones, ya que se elimina la necesidad de un alto número de espermatozoides que, además, deben disponer de velocidades adecuadas para atravesar el tracto reproductivo femenino (Underwood *et al.*, 2010).

El semen fresco convencional tiene un menor porcentaje de espermatozoides vivos que el sexado, tanto fresco (60% vs. 69-74%), como tras su descongelación (60% vs. 55-58%) (Mocé *et al.*, 2006).

El *reverse sex-sorting* o *reverse sort technology*, es una técnica que consiste en la re-criopreservación del semen tras el sexado del mismo (previamente descongelado). Se emplea en semen congelado de carnero y toro (Underwood *et al.* 2009). Esto permite una elevada pureza en la clasificación de espermatozoides congelado-descongelado para re-criopreservar y uso posterior, sin reducción de la capacidad fecundante de los espermatozoides tras dos ciclos de congelación-descongelación (Maxwell y Evans, 2006). Tras la descongelación, se evalúa la motilidad progresiva y la pureza (proporción

del sexo elegido presente) de las dosis producidas, las cuales deben tener un mínimo de 35% de espermatozoides móviles y 85% de pureza para la aprobación de las mismas.

Embriones ovinos obtenidos de semen congelado-descongelado, clasificado y posteriormente re-criopreservados, presentan una calidad ligeramente inferior a los embriones producidos a partir de semen sexado procedente de muestras de semen fresco. El semen sometido a la técnica *reverse sex-sorting*, tiene la capacidad de generar embriones cuya calidad solo desciende ligeramente, como se indica anteriormente, ya que sigue conservando una elevada motilidad, integridad acrosomal, viabilidad y actividad mitocondrial. Además, estos últimos parámetros son superiores en comparación con semen que únicamente ha sido congelado y descongelado (Graaf *et al.*, 2009). Desafortunadamente para la especie bovina, la motilidad y viabilidad espermáticas *in vitro*, particularmente tras la incubación, empeoran con la técnica (Underwood *et al.* 2009). Sin embargo, se han logrado porcentajes de divisiones embrionarias y blastocistos similares a los obtenidos mediante el empleo de espermatozoides sexados y no sexados congelados. Si en vez de utilizar técnicas *in vitro* utilizamos la inseminación artificial, la fertilidad es muy baja y está caracterizada por pérdida de preñez (Underwood *et al.* 2010).

Los autores postulan que el hecho de estar afectada la calidad espermática tanto por el proceso de congelación como por el sexado, explicaría en parte la escasa proporción de blastocistos que se obtiene cuando se utiliza semen sexado congelado (Oses *et al.*, 2009).

La razón por la que se muestran diferencias en el éxito la técnica entre la especie ovina y bovina, se relaciona con la diferente fertilidad de los espermatozoides sexados conseguida con cada una de las especies (superior en ovino según Rath *et al.* en 2013) (Graaf *et al.*, 2009).

Se ha notificado que tras la inseminación con semen bovino y porcino sometido a procesos de sexado y congelación-descongelación, existen alteraciones en la expresión génica de los embriones obtenidos (Maxwell y Evans, 2006).

1.5 Alternativas a la citometría de flujo.

Se han realizado numerosos esfuerzos en el pasado para separar espermatozoides por métodos físicos y cualitativos (marcadores de superficie), pero estos no son útiles

para su empleo a gran escala. En los últimos años se han buscado alternativas a la citometría de flujo tradicional para así, minimizar los inconvenientes de la técnica que repercuten en los resultados obtenidos, derivados de semen sexado. Avances como la reducción de la presión hidrostática (de 50 a 40 psi) ha permitido observar un efecto positivo sobre la fertilidad, ya que se producen mejoras en relación a la calidad espermática y a los porcentajes de preñez (Johnson y Welch, 1999). Estudios recientes empleando presiones de 30 psi han demostrado que se puede lograr un aumento en el porcentaje de preñez con presiones inferiores a las empleadas actualmente. Sin embargo, y debido a la reducción en la velocidad de separación que supondría el empleo de presiones de 30 psi, la recomendación actual son 40 psi (Schenk *et al.*, 2009). Otros avances como el empleo de la modulación de la potencia del láser que se utiliza para excitar al fluorocromo, disminuyen el daño que se provoca al espermatozoide y mejora los porcentajes de motilidad (Guthrie *et al.*, 2002. Schenk *et al.*, 1999).

Métodos como la hibridación in situ fluorescente (FISH) son capaces de distinguir espermatozoides portadores del cromosoma X e Y basándose en las diferentes secuencias de ADN, pero esto requiere la desintegración de la cabeza del espermatozoide. Por ello, surge el sistema *Nanogold* (Figura 7), el cual emplea nanopartículas de oro (AuNP) que identifican secuencias en espermatozoides funcional y morfológicamente intactos (Rath *et al.*, 2013). Primero deben diseñarse las nanopartículas para que puedan penetrar y difundir por el interior del espermatozoide (Shukla *et al.*, 2000). Si se encuentra con un cromosoma Y se produce la hibridación no invasiva de la doble hélice de ADN con la sonda, que lleva incluida la nanopartícula (McKenzie *et al.*, 2008). Esta unión débil produce un desplazamiento batocrómico (la longitud de onda de absorción de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda más grandes o de menos energía por efecto del solvente o por sustituyentes) que permite, mediante el reconocimiento de esta señal específica de sexo, clasificar la población de espermatozoides (Rath *et al.*, 2013).

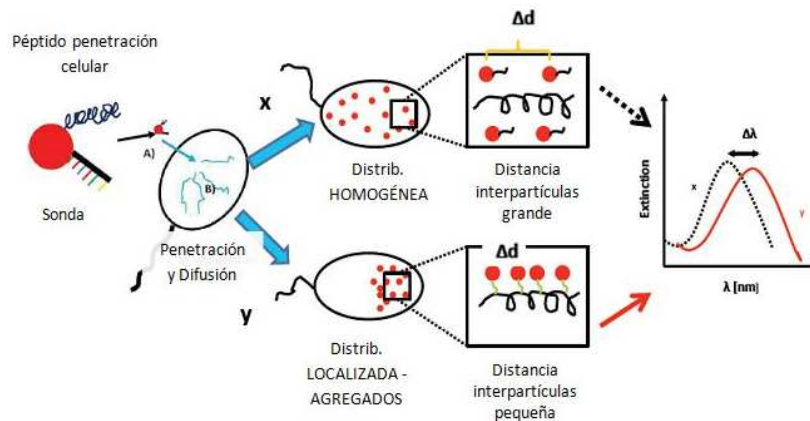


Figura 7: Sistema Nanogold. Modificado de Rath *et al.*, 2013.

A día de hoy no se conocen las alteraciones que dichas partículas pueden provocar en el propio espermatozoide o en las células germinales de la siguiente generación (Taylor *et al.*, 2012). La información actual sobre la citotoxicidad de las nanopartículas es muy heterogénea, y depende de la línea celular en las que se integran. En los pocos estudios realizados en relación con los gametos y el desarrollo embrionario, se ha visto que las nanopartículas de oro son relativamente inertes y menos tóxicas que, por ejemplo, las nanopartículas de plata. Tan solo concentraciones elevadas de las mismas (superiores a 50 μM según Rath *et al.* en 2013), pueden afectar a la motilidad de los espermatozoides o a los porcentajes de fecundación (Schrand *et al.*, 2010).

1.6 El semen sexado en la gestión reproductiva del ganado bovino.

Una de las demandas más importantes en la producción bovina actual es poder controlar el sexo de las crías. Existen diferencias en la proporción de sexos sin necesidad de separar los espermatozoides portadores de los cromosomas que determinan el sexo final de la descendencia. En bovino, la proporción de machos en la inseminación artificial normal o la transferencia embrionaria es de un 51% de machos, mientras que esta proporción es de un 54% para la fecundación *in vitro*, un 53% para las vacas en edad y un 53% en rebaños con pobre manejo. Algunos autores han sugerido que el tiempo de la inseminación artificial también puede alterar la proporción de sexos. Sin embargo, estos resultados son inconsistentes (Garner y Seidel, 2008). Otros factores que se han propuesto son: el estado de maduración del ovocito en la fecundación *in vitro*, las

modificaciones en los procesos de fecundación y las condiciones de cultivo tras la fecundación (Trigal *et al.*, 2012).

Tras numerosos intentos para diferenciar entre espermatozoides X e Y en mamíferos, en 1981 se logró demostrar que se puede medir de manera precisa el contenido de ADN espermático, a pesar de que el proceso mataba a los espermatozoides (Garner y Seidel, 2008). En 1982, Gledhill publica los primeros experimentos sobre citometría de flujo en espermatozoides, los cuales son seguidos por nuevas adaptaciones técnicas a estas células. El primer nacimiento conseguido a partir del empleo de estas técnicas fue en 1989, pero estos esfuerzos iniciales requerían el empleo de una técnica quirúrgica para realizar la inseminación. Más adelante, con nuevos avances y las mejoras logradas en la técnica de la citometría de flujo, así como en la criopreservación seminal, se logran implementar protocolos de campo que hacen posible la selección de la descendencia según los intereses productivos.

La producción de terneros de sexo conocido con la eficacia y eficiencia deseadas, como se observa históricamente, ha sido un objetivo para los investigadores durante años, siendo la eficiencia económica la principal fuerza que conduce a la implementación de una tecnología de sexado de semen en especies domésticas (Garner, 2006). Hoy en día, el procedimiento para el sexado de semen más rápido, fiable y potencialmente más efectivo en relación a su coste, es la citometría de flujo (Trigal *et al.*, 2012). La determinación del sexo de la descendencia puede lograrse de manera precisa y con repetibilidad utilizando un citómetro de flujo, el cual se basa en la medida de la diferencia del contenido de ADN de los espermatozoides de las diferentes especies de mamíferos, ya que el tamaño, el peso, la carga eléctrica, la velocidad, las características de la membrana, el citoplasma y los autosomas de los espermatozoides machos (Y) y hembras (X) son prácticamente idénticos (Garner y Seidel, 2008). La separación de espermatozoides portadores de un cromosoma X ó Y, obteniendo el sexo deseado en la descendencia con una certeza superior al 85% (pureza de la muestra), es posible desde 1989 con la introducción de la citometría de flujo (Johnson y Welch, 1999). Hoy en día, se consigue una pureza de hasta un 95% (Garner, 2006).

Los porcentajes de concepción tras inseminación artificial en bovino están relacionados con el semental, el procesamiento del semen, la dosis espermática, el número de inseminaciones, el lugar de deposición seminal, el manejo y la experiencia del inseminador. Por razones económicas, el número de espermatozoides en dosis

sexadas se reduce de veinte millones a dos millones, y esto disminuye los porcentajes de preñez en torno a un 15-20%. Es de destacar que la fertilidad también se ve reducida empleando dosis más elevadas (diez millones), en comparación con la fertilidad media obtenida con la misma dosis de semen no sexado (DeJarnette *et al.*, 2009).

El semen puede ser colectado, sexado y congelado. También es posible usar semen congelado que es sexado tras la descongelación (*reverse sort technology*), dando la oportunidad de producir embriones del sexo deseado a partir de una pajuela de semen convencional congelada. Esta técnica, conjugada con la fecundación *in vitro*, constituye una poderosa herramienta para los productores, ya que a partir de cualquier semental, podemos obtener descendencia del sexo que más se ajusta a nuestros objetivos de producción (Trans ova genetics, 2013).

Con la utilización de semen sexado en programas de transferencia de embriones, podemos tener la certeza de que 90 de cada 100 embriones, van a ser del sexo elegido ajustándose a los objetivos productivos del criador (leche/carne) y, además, añadiendo un valor: el éxito reproductivo de los animales de la explotación con la mejor genética, o la genética deseada ofertada en el mercado. Los resultados en relación al número de embriones obtenidos tras el lavado uterino dependen de la producción, condición corporal, estado metabólico, ciclicidad, problemas en el posparto, etc., de la vaca seleccionada como donante para el programa (Trans ova genetics, 2013).

A pesar de que la eficiencia de los embriones producidos *in vitro* con semen sexado ha mejorado, llegándose a obtener porcentajes de blastocistos del 45%, en la mayoría de estudios los porcentajes están en torno al 25%. No obstante, la fecundación *in vitro* está considerada una técnica válida en el uso de semen sexado (Carvalho *et al.*, 2010).

En general, el uso de semen sexado incrementa el porcentaje de progreso genético anual en un 15%, en comparación con el semen convencional (Gosálvez *et al.*, 2011). También tiene el potencial de mejorar el manejo del rebaño y de disminuir la incidencia de distocias y los problemas puerperales asociados a ella, evitando el nacimiento de terneros machos, ya que por su mayor peso al nacimiento aumentan estas incidencias y los problemas que se asocian a las mismas.

La posibilidad de incrementar la producción de terneros del sexo deseado tiene importante implicación económica para las industrias cárnica y lechera. Algunos

factores que contribuyen a un beneficio económico son: optimizar los porcentajes de reposición en los rebaños (requerimiento de un menor número de madres para producir un número suficiente de hijas para el reemplazo), reducir la incidencia de distocias y los problemas puerperales asociados a la misma, la posibilidad de mejorar la bioseguridad (granjas de ciclo cerrado) e incrementar el porcentaje de progreso genético anual dando lugar a la producción de hembras de reposición genéticamente superiores (aptitud maternal o láctea) y, en caso de rebaños de carne, descendencia con mérito genético para el crecimiento, porcentajes de conversión o peso en canal. Sin embargo, existen costes añadidos como el alto precio del semen, los programas de sincronización de celos, gastos veterinarios, etc. Además, debemos tener en cuenta la disminución de la fertilidad en comparación con el semen no sexado.

Un factor importante para los productores y para la implementación de un programa de inseminación con semen sexado es la eficiencia conseguida hoy en día en la producción de embriones. El número de hembras para reposición, venta u obtención de valiosos embriones se ha visto incrementado (Gosálvez *et al.*, 2011).

1.7 Estudios relacionados con la fertilidad.

Los porcentajes de fertilidad para el semen sexado, con dosis aproximadas de 2×10^6 espermatozoides y en rebaños con buen manejo, están en torno al 70-80% (para algunos autores alcanza el 90% (Schenk *et al.*, 2009; DeJarnette *et al.*, 2009) de la fertilidad lograda con semen no sexado, en el que las dosis empleadas son superiores ($10-20 \times 10^6$ espermatozoides). Se habla de porcentajes conseguidos en rebaños con buen manejo (buena detección del celo, correcta nutrición, etc.), ya que se ha observado que los porcentajes de preñez con semen sexado son muy bajos con niveles marginales de manejo (no en el nivel óptimo), incluso con el empleo de novillas. Es decir, si con un manejo inadecuado o no óptimo ya se observan reducciones en la fertilidad con semen no sexado, con la utilización de semen sexado este efecto es más acusado. (Garner, 2006). También adquiere importancia un correcto manejo del semen, así como la habilidad del inseminador (DeJarnette *et al.*, 2009).

El porcentaje medio de preñez para semen sexado y utilizado en inseminación artificial en la industria lechera, es de aproximadamente un 51%, aunque puede ser considerablemente más bajo (Trigal *et al.*, 2012; Garner, 2006). En 2002, Seidel y Schenk publican que el porcentaje de concepción varía entre un 31% y un 46%. Sin

embargo, un estudio de Schenk *et al.* (2005), realizado con novillas inseminadas dos veces (12 y 24 horas tras el inicio del celo) con semen procedente de tres toros, obtuvo una porcentaje de un 56%, en comparación con un porcentaje de preñez del 61% a la primera inseminación en las novillas control con semen no sexado.

Parece ser que la clave para lograr porcentajes de preñez semejantes entre novillas inseminadas con semen sexado y no sexado, está en el manejo reproductivo. Para incrementar los porcentajes de concepción aceptables, se debe restringir el uso del semen sexado a novillas de primera y segunda inseminación (Gosálvez *et al.*, 2011). Se han publicado estudios que indican que no existe relación entre el porcentaje de preñez y la edad de la novilla a la primera inseminación, aunque sí establecen una influencia negativa del periodo estival (Donovan *et al.*, 2003. Cerchiaro *et al.* 2007).

En general, el porcentaje de concepción de vacas lecheras (multíparas) es menor con semen sexado (39% vs. 57%) (Garner y Seidel, 2008). Las vacas lecheras en elevada producción tienen un largo periodo en balance energético negativo, siendo la energía ingerida a partir de la dieta insuficiente para cubrir la energía que se requiere para la producción de leche. Las novillas no producen leche y, por ello no tienen este periodo de balance energético negativo, mejorando así los porcentajes de preñez. Por lo tanto, son animales más adecuados a la hora del empleo de semen sexado en una explotación (Garner, 2006).

Se ha de tener en cuenta que, la inseminación de vacas lecheras en lactación con dosis bajas de semen sexado (1 ó $1,5 \times 10^6$ espermatozoides), no producen porcentajes de preñez aceptables, incluso si tras la descongelación la motilidad progresiva es superior al 35% (mínimo de aceptación) (Garner, 2006). Algunos estudios evidencian un descenso de un 5-10% en el porcentaje de concepción cuando se usan dosis de 2×10^6 espermatozoides, en comparación con dosis de espermatozoides de 15×10^6 . Por el contrario, otros estudios no hayan diferencias significativas en el porcentaje de preñez con dosis bajas, comparando con dosis tradicionales de 20 millones (Seidel *et al.*, 1999. Seidel y Schenk, 2008). Tampoco se han hallado incrementos en el porcentaje de preñez de novillas inseminadas a las 12 y 24 horas tras el celo, cuando se utilizan dosis de entre 2 y 6×10^6 espermatozoides. Para remarcar aún más la importancia del número de espermatozoides contenidos en la pajuela, (Gosálvez *et al.* (2011) evidencia que la utilización de dosis de semen sexado y no sexado, de 2×10^6 espermatozoides, no muestra diferencias en los porcentajes de preñez. Es decir, disminuyendo el número de

espermatozoides contenidos en una pajuela de semen no sexado llegamos a igualar el porcentaje de concepción obtenido con semen sexado, aunque sean porcentajes de hasta un 30% menos.

También cabe destacar disminuciones significativas en los 56 días de no retorno utilizando semen sexado. Esto es, en dos de cada tres casos, debido a la baja dosis de espermatozoides por dosis, pero en el resto de casos se debería al proceso de separación (Gosálvez *et al.*, 2011). Los efectos de las bajas dosis y del sexado difieren entre toros (Frijters *et al.*, 2009).

Los bajos porcentajes de fertilidad están relacionados no solo con la baja concentración espermática empleada en las dosis, sino también con los daños en el ADN (Arruda *et al.*, 2012). La fragmentación en el ADN espermático, tiene un impacto negativo sobre la fertilidad (diferencias individuales), aunque en la infertilidad, son más importantes los cambios en la condensación de la cromatina espermática

Es importante destacar que la pérdida de fertilidad causada por daños en el ADN no se compensa incrementando el número de espermatozoides, ya que podemos dar lugar a un cigoto no viable, fallos en el desarrollo embrionario o descendencia débil que no sobrevivirá (*Figura 1*). Además, la presencia de espermatozoides con daños en el ADN puede bloquear a los sanos (DeJarnette, 2010).

El intervalo óptimo para realizar la inseminación con semen no sexado no es comparable con respecto al empleo de semen sexado. Entre las distintas razones se destacan: la reducida vida útil del semen sexado en el tracto reproductivo femenino, el menor número de espermatozoides contenidos en las dosis, y la posible pre-capacitación inducida por el proceso de sexado (Seidel *et al.*, 2011). El tiempo de inseminación influye en el porcentaje de preñez, la cual se ve incrementada cuando la inseminación tiene lugar en un periodo cercano a la ovulación. El uso de técnicas de sincronización puede reducir la variación dada por el momento de la ovulación, incrementando la eficiencia de los programas de inseminación que emplean semen sexado. Una posibilidad para incrementar los porcentajes de preñez en novillas inseminadas con semen sexado sería el uso de GnRH el día de la IA, aunque estudios recientes no evidencian esos incrementos (Gosálvez *et al.*, 2011). Se debe tener en cuenta que no se recomienda la utilización de semen sexado en novillas sincronizadas para inseminación a tiempo fijo (IATF), ya que los porcentajes de preñez también son menores. Por

consiguiente, para lograr la mejor eficiencia se deben inseminar novillas en buena condición corporal y a celo detectado (Seidel, 2007).

No hay una conclusión final establecida que corrobore o niegue hipótesis que aseguran que la inseminación cercana al lugar de ovulación provee mejores resultados de fertilidad, o incrementos en los porcentajes de preñez cuando la inseminación se realiza en el cuerno ipsilateral al folículo dominante (Gosálvez *et al.*, 2011).

También se observan diferencias entre toros. Hay toros cuyos espermatozoides sobreviven mejor al sexaje que otros y, por consiguiente, el semen debe ser evaluado en su potencial fecundante después del sexaje, tanto para programas de inseminación artificial convencional como para programas de transferencia de embriones o de producción de embriones *in vitro* (Hayakawa *et al.*, 2009). Si un toro muestra pobre fertilidad (número bajo de gestaciones en relación al total de novillas o vacas inseminadas con sus dosis seminales) con semen no sexado, no se ofertarían dosis de ese toro (Garner, 2006). Se observan mayores variaciones de porcentajes de preñez entre toros, cuando se emplea semen sexado en vacas, en comparación con su empleo en novillas (Seidel *et al.*, 1999). Hay estudios que concluyen que el 20% de la población de toros son de elevada fertilidad y logran porcentajes de concepción “normales” con bajos números de espermatozoides. Otro 20% está constituido por una población de baja fertilidad, para la cual se necesitan mayores concentraciones de espermatozoides por inseminación para lograr el umbral de fertilidad “aceptable”, sin conseguir los porcentajes de preñez logrados con los toros de alta fertilidad (Seidel y Schenk, 2008). Hay que tener en cuenta que la fertilidad del semen sexado de un toro determinado no puede ser evaluada con precisión mediante ensayos de campo preliminares con semen no sexado y usando las dosis comerciales habituales para éste (Frijters *et al.*, 2009. DeJarnette *et al.*, 2009).

Es fundamental el correcto procesamiento de las dosis seminales, ya que puede interferir en el porcentaje de preñez obtenida. Cerca de un 20% del total de espermatozoides contenidos en una pajuela (2×10^6 espermatozoides), se pierden durante el proceso de separación, centrifugación o llenado de la pajuela (Garner, 2006).

La duración de la gestación, la mortalidad neonatal, el peso al nacer, así como el porcentaje de vida al destete no muestran diferencias entre los grupos control y las hembras inseminadas con semen sexado. El porcentaje de abortos con semen sexado tampoco muestra diferencias en comparación con el semen convencional, así como

otros parámetros en relación con los terneros nacidos (*Tabla 1*) (Seidel, 2007). Sería importante continuar con un seguimiento de las generaciones siguientes a estos terneros nacidos de semen sexado, por si se acumulan efectos negativos que indicarían que el proceso de sexado alteraría el ADN de los espermatozoides que fecundan al ovocito (Garner, 2009).

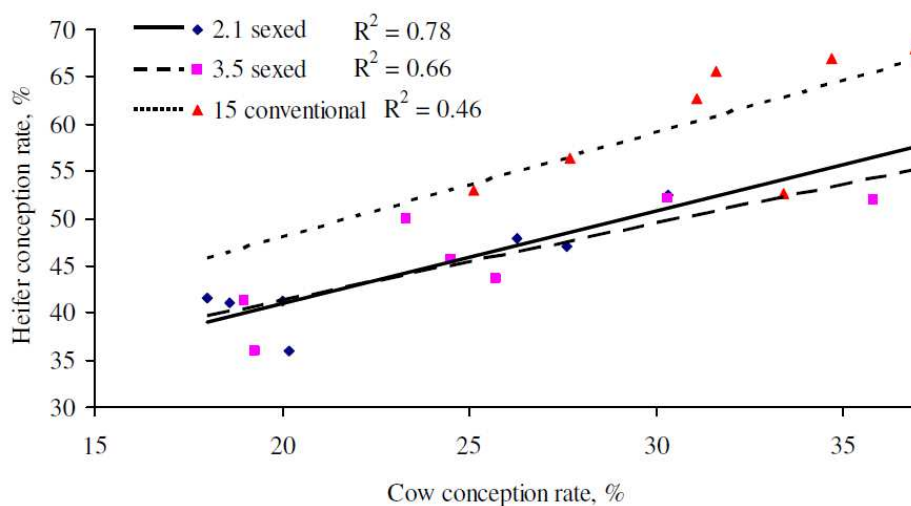


Figura 1: Relación entre los porcentajes de concepción de vacas y novillas Holstein con dosis de semen sexado de 2,1 y 3,5×10⁶ espermatozoides, y dosis de semen convencional no sexado de 15×10⁶ espermatozoides. (DeJarnette *et al.*, 2010).

Tabla 1: Comparativa entre semen sexado y no sexado. Modificada de Seidel, 2007.

	Semen sexado	No sexado
Número de IA	1158	787
Porcentaje de aborto (%)	4,5	5,0
Duración de gestación (días)	279	279
Muerte neonatal (%)	3,5	4,0
Facilidad de parto	1,22	1,23
Peso al nacimiento (kg)	33,9	34,1
Supervivencia al destete (%)	91,7	91,5
Peso al destete (kg)	239	241

1.8 Fertilidad y análisis *in vitro*.

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario. La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, si ha de tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de criopreservación (Muiño *et al.*, 2005).

Según Kathiravan *et al.* (2011) la carencia de relación significativa entre motilidad y fertilidad puede ser debida a multitud de causas, entre las que se incluyen la variabilidad individual entre toros, el número de espermatozoides en la pajuela, etc. El sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), valora la motilidad y velocidad de cada espermatozoide mediante diferentes parámetros. La motilidad progresiva, por sí sola, contribuye en un 62,6% en la variación del porcentaje de fertilidad, y en conjunto con la valoración de la integridad de membrana, en un 64,1%. Los parámetros de velocidad (*Figura 2*) según la trayectoria suavizada o media (VAP) y velocidad según la trayectoria rectilínea (VSL), contribuyen en un 41,2%, mientras que, si éstos se asocian con la motilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides que reaccionan en un medio hiposmótico, se alcanza el 66,1%. Por tanto, las diferentes características espermáticas valoradas mediante el sistema podrían ser empleadas para al menos descartar dosis de baja fertilidad en la especie bovina. Sin embargo, otros parámetros, también medidos con el CASA, como la linealidad (LIN), rectitud (STR), amplitud del movimiento lateral de cabeza (ALH) o frecuencia de cruce de batido (BCF), no presentan correlación con la fertilidad en el toro.

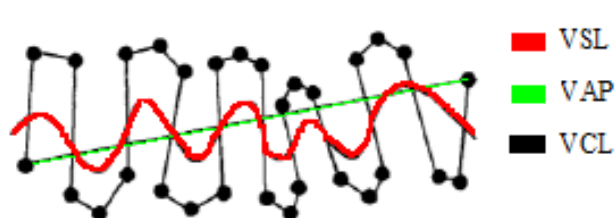


Figura 2: Dibujo representativo de los parámetros de velocidad analizados mediante el sistema CASA ($\mu\text{m/s}$).

Con respecto a la correlación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis seminales hay discrepancia entre autores. Ericsson *et al.* (1989), identificó una relación lineal entre el número de espermatozoides viables en una dosis de inseminación y la capacidad de fecundar a los ovocitos *in vivo*. Sin embargo, los test convencionales de identificación de la integridad de la membrana de los espermatozoides están débilmente correlacionados con la fertilidad (Graham *et al.*, 1990). Decuadro *et al.* (2002) y Christensen *et al.* (2004), hablan de una correlación elevada entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis, siempre que se respete una concentración espermática mínima por pajuela. Sin embargo, Graham (2001) observó que apenas había correlación (Muiño *et al.*, 2005).

Los nuevos sistemas computerizados para el análisis de la motilidad y morfología espermáticas, junto con las tecnologías de fluorescencia, permiten adquirir, de forma rápida y objetiva, datos precisos y repetibles sobre múltiples parámetros relativos a características estructurales y funcionales de los espermatozoides. No obstante, no existe ningún método que por sí mismo sea capaz predecir la capacidad fecundante del semen (Rodríguez-Martínez y col., 1997).

La valoración de los porcentajes de anomalías en la morfología espermática resulta de interés, ya que cualquier anomalía, que afecte a un número elevado de espermatozoides puede llegar a comprometer la fertilidad del semen, aunque la motilidad del eyaculado sea buena. De todas maneras, la evaluación de formas anormales sólo va a permitir descartar aquellas muestras con niveles por encima de ciertos límites, sin tener un poder predictivo real sobre la fertilidad de las muestras. Realmente no se sabe cuál es el porcentaje máximo de morfoanomalías espermáticas que puede ser compatible con una fertilidad normal. Además, está demostrado es que existe una correlación negativa entre el número de formas anormales y la fertilidad del seminal. Así, al menos un 70% de los espermatozoides deberían ser normales (Nöthling y Irons, 2008), y se ha demostrado que los toros con mayor porcentaje de fertilidad tienen una mayor viabilidad espermática y una menor incidencia de espermatozoides morfológicamente anormales (Vogler *et al.*, 1993). De todas maneras, la relevancia de distintos tipos de morfoanomalías es muy variable. Así, el límite superior de los defectos espermáticos de cabeza se encuentra en un rango de entre el 15% y el 20%, mientras que los defectos acrosomales y de cola pueden llegar a un 25% sin afectar la fertilidad. Existen estudios que han demostrado que el proceso de

criopreservación favorece el incremento de formas anormales en el eyaculado (Muiño *et al.*, 2005).

Muchos autores afirman que la fertilidad en el campo del toro y el verraco se correlaciona con los resultados del test SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), y que algunos límites propuestos para el Índice de Fragmentación del ADN obtenido con esta técnica (DFI) identifican individuos subfértiles (Waterhouse *et al.*, 2006). Bollwein *et al.*, (2008) no encontraron relación entre SCSA y la fertilidad en campo trabajando con semen bovino. Sin embargo, tras la descongelación de muestras descongeladas a 38 °C durante 3 horas, obtuvieron una correlación negativa entre el DFI y los 56 días de no retorno al celo. Según un estudio realizado por Pluglisi *et al.* (2012), los toros clasificados como de baja fertilidad (porcentajes de no retorno al celo a los 56 días inferiores a -1,5), tienen valores inferiores de motilidad total e integridad de membrana espermática y un valor superior de DFI, en comparación con toros de fertilidad media (porcentajes de no retorno al celo a los 56 días entre -0,5 y +0,5) y alta fertilidad (porcentajes de no retorno al celo a los 56 días, igual o superiores a +1,5). Los valores que se citan en este párrafo son números relativos al nivel 0, que coresponden a los machos de fertilidad “media”. Además, estos autores concluyeron que el porcentaje de DFI permite la identificación de hasta el 70% de los toros con baja fertilidad, y que este porcentaje, en combinación con la integridad de membrana, la velocidad espermática y la habilidad competitiva de unión a la zona pelúcida del ovocito, permite la identificación de hasta un 78% de estos machos.

Hay que tener en cuenta que existen factores que influyen en los resultados del test SCSA. Entre éstos, la preparación de la muestra estándar, las condiciones y tiempos de desnaturalización y tinción, la calidad del naranja de acridina (debe ser purificado cromatográficamente), el ajuste de la concentración espermática y la dilución con la solución de naranja de acridina (debe estar en equilibrio con la muestra espermática), etc. (Boe- Hansen *et al.*, 2005).

En un estudio se observa como la adición de plasma seminal, no ejerce ningún efecto que suponga un incremento en la misma. Es interesante destacar que, en la especie ovina, la adición de plasma seminal a espermatozoides descongelados, incrementa la penetración de estos a través del moco cervical y el porcentaje de preñez tras inseminación cervical. Este experimento demostró que el compromiso en la función espermática derivado de la criopreservación, puede ser contrarrestado mediante la

adición de plasma seminal (en la especie ovina). En verraco, se han indicado incrementos en la resistencia espermática al choque por frío, y en la habilidad para sobrevivir a la congelación-descongelación cuando el plasma seminal se encuentra en contacto con los espermatozoides durante el tiempo de espera (2-7 horas) hasta la congelación (en la congelación no está presente para evitar efectos tóxicos derivados de éste) (Maxwell y Johnson, 1999). Se deberían considerar las diferencias entre machos en relación los componentes del plasma seminal, ya que estos pueden influir en la variación de la calidad espermática tras la descongelación (Fraser y Strzeżek, 2007).

1.9 Uso del semen sexado en transferencia embrionaria (TE).

En programas de TE, el semen sexado se ha utilizado tanto en inseminaciones a celo detectado como en inseminaciones a tiempo fijo (IATF). En la mayoría de estos trabajos se han obtenido resultados inferiores a los logrados con el semen convencional (Oses, 2009). También es de destacar que se han publicado datos que indican que se consigue hasta un 15% más de porcentajes de preñez tras inseminaciones a celo visto, en comparación con IATF. Además, y a tener en consideración, se necesita un semen de alta fertilidad para lograr resultados óptimos con la IATF (Schenk *et al.*, 2009).

El intervalo ideal de edad para semen convencional está entre los 4 y los 10 años. Pudiendo emplear novillas púberes (12–16 meses). En vacas debemos respetar un mínimo de 70 días posparto. Las vacas donantes seleccionadas para semen sexado deben ser jóvenes y, desde el punto de vista físico, con un estado sanitario adecuado y sin problemas previos en reproducción. Un criador que desee tener como donante a una hembra vieja o problemática (fertilidad), debe seguir un programa de fecundación *in vitro* para incrementar así las probabilidades de éxito en la técnica, ya que es posible observar una ligera reducción en el número total de embriones fecundados por lavado uterino cuando se emplea semen sexado (Trans ova genetics, 2013). Los porcentajes de fecundación en vacas superovuladas están en torno al 65%, lo cual es aproximadamente un 20% inferior a los porcentajes que se derivan de vacas sin tratamiento (Schenk *et al.*, 2006). También, hay que considerar que hay estudios que demuestran que las novillas producen un mayor número de embriones fertilizados que las vacas (Hayakawa *et al.*, 2009).

Los programas de transferencia de embriones consiguen una media de 6 embriones transferibles por colecta, lo cual se reduce a 3-5 embriones cuando empleamos semen sexado. Sin embargo, la gran ventaja del semen sexado es la de conseguir un 90% de embriones del sexo deseado (Trans ova genetics, 2013). El número de embriones de buena calidad recolectados cuando se emplea semen sexado es la mitad si se compara con el empleo de semen no sexado. Sin embargo, si el sexado de un embrión no justifica los gastos de la transferencia embrionaria, el uso de semen sexado puede ser una mejor opción que la biopsia de embriones, ya que esta última, además de tener un coste, reduce la viabilidad del embrión (porcentajes de preñez significativamente menores). Cabe concluir que, mediante el empleo de semen sexado, se puede obtener un número similar de embriones del sexo deseado, ya que tras el sexado de los embriones se descartan aquellos de sexo no deseado que, aproximadamente, son la mitad del total de embriones recogidos tras el lavado uterino (Seidel, 2010).

El uso de semen sexado en la práctica de la transferencia de embriones, requiere de dos inseminaciones y el empleo de 2 ó 3 dosis seminales (5×10^6 espermatozoides cada una), en cada inseminación, por vaca donante superovulada. Sin embargo, algunos criadores optan por inseminar una única vez a las 12 horas del inicio del estro. Esto incrementa los porcentajes de ovocitos no fertilizados obtenidos tras el lavado uterino. Dichos porcentajes se pueden reducir mediante el empleo de la técnica de fecundación *in vitro*, que maximiza el número de embriones obtenidos de una o dos dosis seminales con semen sexado. Además, podemos emplear dosis seminales de machos distintos, separando el total de ovocitos obtenidos tras la colecta (Trans ova genetics, 2013). La mejor aproximación para maximizar la producción de embriones es la inseminación de novillas donantes con dos dosis de 10×10^6 espermatozoides sexados (Hayakawa *et al.*, 2009).

Las vacas muestran un menor porcentaje de generación de embriones que las novillas, a pesar de que se colectan mayor número de ovocitos en las primeras (condiciones uterinas del posparto, transiciones fisiológicas, etc.). Este porcentaje, también se ve disminuido con la utilización de semen sexado (Gosálvez *et al.*, 2011).

Inseminaciones múltiples o incrementos en la dosis espermática pueden ser ventajosos para la producción embrionaria cuando se utilizan protocolos en los que se realiza una única inseminación a tiempo fijo. Sin embargo, debemos tener en cuenta que

serán colectados un menor número de embriones transferibles que cuando se emplea semen no sexado, a pesar de que algunos investigadores han logrado obtener un número similar. Las diferencias entre los distintos resultados pueden ser debidas a la interacción de factores (calidad y cantidad espermática, potencial de fecundación, respuesta ovulatoria de la donante, colecta de embriones, viabilidad, número de inseminaciones y tiempo), que parecen influir en el éxito de los programas de superovulación (Gosálvez *et al.*, 2011).

Usando tiempos de inseminación de 18 y 30 horas tras la detección del estro en vacas donantes superovuladas se incrementa el número de embriones colectados tras el lavado uterino, en comparación con inseminaciones a las 12 y 24 horas en los protocolos habitualmente empleados (Gosálvez *et al.*, 2011). Si se emplea semen sexado en programas de sincronización de celos, es recomendable (según otros estudios) realizar la inseminación a tiempo fijo (IATF) 12 horas después de la recomendada para semen no sexado, consiguiendo porcentajes de fecundación aceptables y manteniendo una adecuada calidad embrionaria (la viabilidad del ovocito en el tracto genital se reduce tras 8 horas) (Schenk *et al.*, 2009. Garner, 2009). Hay autores que indican en sus estudios que ajustando el tiempo de inseminación con semen no sexado a la ovulación, la calidad embrionaria se reduce y. sin embargo, con el uso de semen sexado, dicha calidad embrionaria se mantiene. Esto último se podría deber a la inducción de la capacitación que los espermatozoides sexados experimentan durante el proceso de separación. De hecho, recientes estudios indican que la principal causa de fallo en los programas de multiovulación y transplante de embriones (MOET), empleando semen sexado, es el descenso de los porcentajes de fecundación, y no la baja calidad embrionaria (Garner, 2009).

Por lo tanto, se ha llegado a la conclusión de que el semen sexado congelado puede ser aplicado en los programas MOET, ya que no hay una afectación significativa en la producción de embriones si hacemos una comparación con semen no congelado (Hayakawa *et al.*, 2009). El éxito en el uso de semen sexado en programas MOET, depende de la dosis de inseminación, entre otros factores. Los buenos resultados obtenidos cuando se emplean dosis de 10 a 20 millones de espermatozoides parecen depender del semental y de las condiciones del programa MOET. También es importante tener en cuenta que la fertilidad descende en vacas donantes inseminadas

con dosis de $6-8 \times 10^6$ espermatozoides, incluso si la inseminación se lleva a cabo en el cuerno uterino (Gosálvez *et al.*, 2009. Rath *et al.*, 2013).

Teniendo presente que existen diferencias individuales entre toros, se debe seleccionar, si se quieren lograr resultados deseables, un semen que proporcione una alta resistencia al proceso de sexado, altos porcentajes de división, etc. (Gosálvez *et al.*, 2011). Hay estudios que demuestran un efecto significativo del toro sobre el porcentaje de división embrionaria. pero no así sobre la producción de blastocistos (Oses *et al.*, 2009).

Un porcentaje aceptable de blastocistos, indica que el semen sexado puede ser utilizado en la producción *in vitro* de embriones. Sin embargo, la alta variabilidad de los resultados, el alto porcentaje de contaminación, la reducida capacidad fecundante y las alteraciones estructurales, indican que se requieren mejoras adicionales para minimizar el daño de los espermatozoides durante el proceso de separación y conservación, para su aplicación con éxito en un programa comercial (Oses *et al.*, 2009).

1.10 Uso del semen sexado en fecundación *in vitro* (FIV).

El porcentaje de fecundación con semen sexado parece probable que disminuya al realizar FIV. En programas de fecundación *in vitro* con semen sexado, existen evidencias que indican una reducción de en torno al 10-20% en la obtención de embriones, en comparación con dosis de semen convencional (Seidel, 2007. Trigal *et al.*, 2012). Existen dos principales razones que explican este descenso. La primera recae en el proceso de sexado, el cual añade un estrés a la célula espermática, y la segunda se debería a las bajas dosis utilizadas en la inseminación (Trans ova genetics, 2013). Para la obtención de embriones mediante FIV con semen sexado, debemos considerar que se necesitan mayores concentraciones de espermatozoides que cuando utilizamos semen no sexado (Barcelo-Fimbres *et al.*, 2011. Rath *et al.*, 2013).

Según Gosálvez *et al.* (2011), los embriones obtenidos *in vitro* con semen sexado, a pesar de que estos experimentan una reducción en la integridad de la membrana y la motilidad progresiva, no ven afectados su viabilidad ni desarrollo a la desvitrificación. Sin embargo, otros autores indican que se producen modificaciones en la ultraestructura embrionaria, lo cual compromete el desarrollo. Dichas modificaciones pueden explicarse por la fragmentación en el ADN espermático, que puede ser más o menos

acusada dependiendo del toro elegido (Gosálvez *et al.* 2011). Según otros estudios, los embriones bovinos producidos mediante FIV con semen sexado parece que tienen alterados los patrones expresión del ARNm. es decir, la expresión génica es diferente entre los embriones derivados de semen sexado y los derivados de semen no sexado (Garner, 2009).

En contra de lo expuesto anteriormente, ciertos estudios demuestran que el uso de semen sexado, si se compara con el uso de semen sin sexar, no reduce el desarrollo embrionario de embriones obtenidos mediante FIV ó IA. Se indican efectos negativos, derivados del proceso de sexado, en la integridad espermática. sin embargo, cuando se seleccionan espermatozoides mediante un gradiente de Percoll, los porcentajes de divisiones y de blastocistos obtenidas no se ven afectados. Los cambios en la calidad espermática tampoco afectan a los porcentajes de fecundación o de formación de blastocistos (Xu *et al.*, 2006. Carvalho *et al.*, 2010). Esto hace pensar que las variaciones en los métodos de selección espermática (volúmenes de gradiente, tiempos y potencias de centrifugación), pueden contribuir a las diferencias entre estudios. Con el empleo de un gradiente de *Percoll*, se amplía la confianza a la hora de optar por embriones producidos mediante semen sexado.

La alta variabilidad entre estudios en el desarrollo de embriones bovinos obtenidos mediante procedimientos *in vitro* con semen sexado, puede deberse, además de a lo citado con anterioridad, al elevado efecto del macho en la eficiencia de un programa de FIV. (Trigal *et al.*, 2012). Además, el empleo de un medio de cultivo libre de suero (BBH7) podría mejorar la supervivencia embrionaria tras la criopreservación, en comparación con embriones cultivados en fluido oviductal sintético, puesto que una de las razones del descenso de supervivencia embrionaria tras la criopreservación, son las condiciones subóptimas del medio empleado durante el cultivo (Block *et al.*, 2010). Según otros estudios, parece ser que el medio de cultivo no afecta el desarrollo de los embriones macho o hembra, aunque sí se han detectado efectos sobre el desarrollo embrionario (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. SERIDA, 2009).

De todas formas, la capacidad de desarrollo de estos embriones no solo depende del medio empleado, también depende del toro y del daño infligido al espermatozoide durante el proceso de sexado, entre otros factores (Trigal *et al.*, 2012).

La utilización de semen sexado en FIV requiere la posterior verificación del sexo de los embriones, con el fin de confirmar la eficacia del proceso de separación de los espermatozoides por citometría de flujo. Para ello, se dispone de una técnica de sexaje por PCR (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. SERIDA, 2009).

1.11 Futuro del semen sexado.

El uso de semen sexado debería incrementar el progreso de los programas de mejora genética a pesar de que no se han obtenido buenos resultados con todos los toros. Además, con un menor número de hembras, lograríamos constituir la siguiente generación de novillas. No obstante, podrían verse incrementados los problemas de consanguinidad. Sería también necesario calcular los cambios en el progreso genético, así como anotar las alteraciones génicas que se puedan producir y sean detectadas anualmente. La anotación de alteraciones génicas es de interés, puesto que se ha notificado que tras la inseminación con semen bovino y porcino sometido a procesos de sexado y congelación-descongelación existen alteraciones en la expresión génica de los embriones obtenidos (Maxwell *et al.*, 2006).

Varias mejoras recientemente logradas en semen sexado lo hacen más eficiente y producen menores daños espermáticos. El futuro uso de las nanopartículas de oro y el método de desviación son dos modificaciones específicas que pueden mejorar la longevidad y capacidad fecundante del semen sexado. Además, las adaptaciones biológicas han producido un incremento en la eficiencia de la misma y en la calidad espermática tras la clasificación.

La inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), puede ser empleada en la producción de embriones con la misma eficiencia en semen sexado y no sexado. Además, soluciona el coste de la producción de dosis y los problemas de baja concentración espermática de las dosis. Sin embargo, en bovinos, la ICSI llevada a cabo con semen sexado tiene una habilidad limitada en la producción de oscilaciones de calcio para iniciar la activación del ovocito, hecho que compromete su éxito (Gosálvez *et al.*, 2011).

2. Hipótesis y objetivos.

El presente trabajo se plantea como una aproximación y primer paso para la realización de una tesis doctoral.

Pensamos en sacar una serie de conclusiones útiles que nos servirán de inicio para la realización de un trabajo experimental de mayor amplitud y con resultados de fertilidad avalados por pruebas en campo, de los cuales no disponemos, ni sería posible elaborar en el tiempo dedicado al Trabajo Fin de Máster.

Nuestro objetivo principal fue valorar la calidad de las muestras espermáticas posdescongelación de varios machos de la especie bovina. Acordamos realizar el experimento con pajuelas de semen sexado y no sexado, para evaluar el patrón de disminución de la calidad entre los dos tipos de semen. También decidimos evaluar las diferencias entre machos a distintos tiempos y la influencia del proceso de sexado sobre la calidad de las muestras seminales.

Por lo tanto, se plantearon los siguientes objetivos para el trabajo:

1. Determinar el efecto del tiempo de incubación post-descongelación en dosis sexadas y no sexadas, para estimar su longevidad. La calidad espermática se evaluó, por lo tanto, tras descongelar y a las 3 h a 37 °C, y el estado del ADN espermático a las 24 y 48 h, de acuerdo con estudios previos.
2. Comparar los machos utilizados en el estudio, tanto respecto a la calidad tras descongelar como en la evolución de las muestras durante el tiempo de incubación. Los estudios previos han insistido en la problemática de la variabilidad entre machos en la calidad de las dosis sexadas, de ahí la importancia de caracterizar las muestras de distintos toros con vistas a su utilización en futuros trabajos.
3. Realizar el análisis de las formas anormales presentes, utilizando un sistema de clasificación lo más completo posible, tras descongelar las dosis de semen convencional y sexado. De esta forma podíamos valorar si el semen sexado presenta un mayor, igual, o menor porcentaje de morfoanomalías, en relación a las dosis de semen sin sexar, así como las diferencias entre machos

3. Materiales y metodologías.

3.1 Reactivos y soluciones.

Todos los reactivos fueron de grado reactivo o superior. Para el pesaje de los reactivos se empleó una balanza de precisión AE200 (Mettler-Toledo, Nueva York, EEUU). Todas las soluciones que utilizamos (*Tabla 3*) se prepararon con agua ultra pura Milli-Q proporcionada por un dispensador de Milli-Q Synthesis A10 (Millipore Corporation, Bedford, EEUU). Para conseguir una correcta dilución de los reactivos, utilizamos un agitador magnético Basicmagnix (Lovango S.L., Barcelona, España). Los proveedores de los reactivos que empleamos fueron: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steingheim, Alemania), Invitrogen y Fresenius Kabi, S.A..

Tabla 3: Reactivos utilizados para la elaboración de soluciones y medios.

Solución	Descripción	Localización
Glutaraldehído al 2%.	Solución fijadora de espermatozoides para valorar la concentración espermática.	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 4</i>
Stock 10X de TNE (Tris/NaCl/EDTA).	Medio tamponado que utilizamos para diluir las muestras seminales que serán evaluadas por el método SCSA.	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 5</i>
Medio detergente-ácido para SCSA.	Permeabiliza las membranas de los espermatozoides. Además, su bajo pH desnaturaliza el ADN donde la cromatina es más laxa o la doble hélice está rota en una o las dos cadenas. Se utiliza para preparar las muestras antes de teñirlas con naranja de acridina en la técnica SCSA.	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 6</i>
Solución de tinción para SCSA.	El naranja de acridina es un colorante metacromático. Emite color verde cuando se une al ADN de doble hebra, y de color rojo cuando se une al ADN de hebra sencilla.	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 7</i>
Solución stock de PNA-FITC.	Colorante que tiñe acrosomas dañados por su afinidad a la parte interna de la membrana acrosomal externa. Emite fluorescencia verde cuando es excitado a longitudes de onda de 530/40.	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 8</i>

Solución	Descripción	Localización
Solución stock de Ioduro de Propidio.	El PI entra en espermatozoides con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y emite fluorescencia roja que es recogida por FL3 (613/20).	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 9</i>
Solución stock de Mitotracker deep red	Difunde por la membrana plasmática uniéndose específicamente a los lípidos de membrana de las mitocondrias funcionales. Emite una fluorescencia roja que es recogida por FL5 (750LP).	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 10</i>
Solución stock de YO-PRO-1.	Identifica los espermatozoides apoptóticos y muertos y emite una fluorescencia verde que es recogida por el fotodetector FL1 (530/40).	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 11</i>
Solución stock de Hoechst 33342.	Hoechst 33342 emite fluorescencia azul recogida por FL6 (450/50) y nos ayuda a excluir los debris del análisis.	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 12</i>
Solución tinción combinada n° 1.	(IP/ PNA-FITC/ Hoechst 33342).	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 13</i>
Solución tinción combinada n° 2.	(IP/Mitotracker deep red/ YO-PRO-1/Hoechst 33342).	<i>Anexo 1</i> <i>Tabla 14</i>

La preparación de las distintas soluciones aparecen detalladas en el *anexo I*.

3.2 Diseño experimental.

En este trabajo valoramos la calidad de las muestras espermáticas mediante su análisis por varias técnicas y procedimientos. En primer lugar, analizamos las formas anormales presentes. Evaluamos la motilidad de las dosis mediante el sistema CASA. Mediante el citómetro de flujo valoramos la viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad mitocondrial de los espermatozoides. Estimamos el daño del material genético valorando la estabilidad de la cromatina espermática por el método SCSA.

3.3 Sementales empleados.

Empleamos cuatro machos (*Figura 8*). De cada macho utilizamos dos dosis de semen sexado. De unos de ellos empleamos dos dosis de semen no sexado. Los toros son de raza Frisona de alto valor genético, con buena fertilidad en campo y con aptitudes adecuadas para el sexado y la congelación de sus dosis seminales. Dichos sementales son sexados por *Cogent*, una empresa de Lea Lane, Aldford, Chester (Reino Unido). Esta empresa fue la primera compañía que comercializó el semen sexado, llevando ya 14 años dedicándose a la difusión de la genética de sementales mediante la venta de semen, tanto sexado como no sexado, para su uso en inseminación artificial.

Las dosis nos las proporciona Semex España, S.A. que desde hace 35 años ha contribuido a mejorar la genética de las ganaderías.

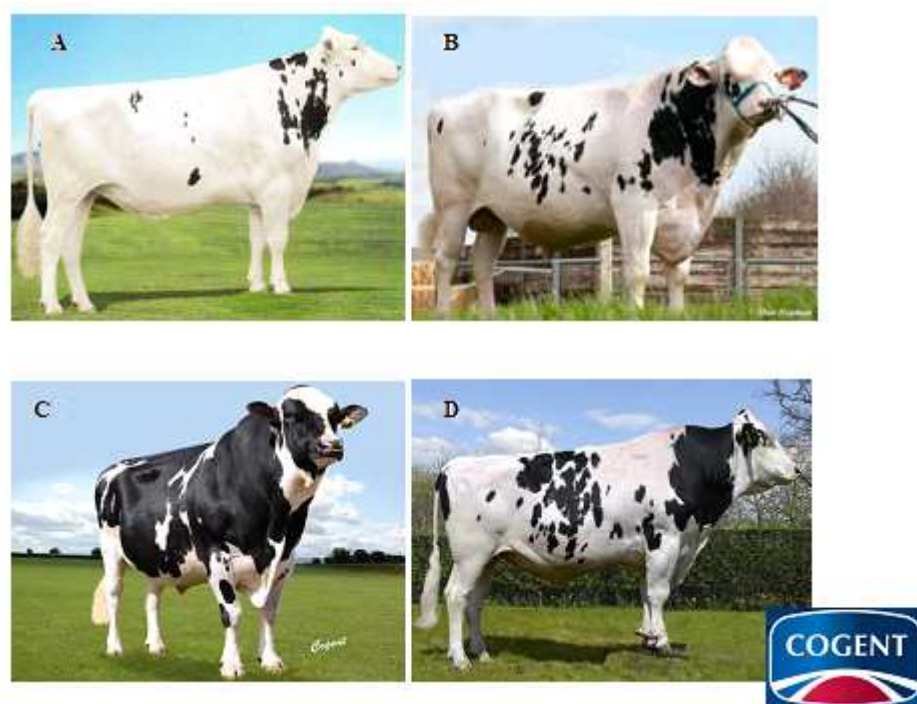


Figura 8: Alino (A). Mordor (B). Courier (C). Painley (D). Ceditas por *Cogent*.

3.4 Recolección, valoración y sexado seminal.

Cogent es la empresa encargada de llevar a cabo los protocolos de recolección y valoración, así como del sexado seminal. El semen de los cuatro toros que entran en nuestro experimento fue recogido mediante vagina artificial. Los toros estaban alojados en el centro de Reino Unido. En la presente memoria no se especifican los protocolos de valoración ni de sexado debido a la confidencialidad en términos de acuerdo de licencia.

El citómetro de flujo que emplea Cogent para el sexado seminal (DakoCytomation MoFlo SX). Se trata de un citómetro de alta velocidad que cuenta con separadores específicos para la separación espermática.

3.5 Congelación, descongelación seminal y cálculo de la concentración espermática.

La congelación de las dosis se realiza mediante biocongelador programable de nitrógeno líquido. Los medios incluyen yema de huevo y glicerol como crioprotectores.

Para llevar a cabo el proceso de descongelación las pajuelas se extrajeron de dos en dos del cánister en el que estaban contenidas y se sumergieron en un baño termostático (Nüve NB20, Ankara, Turquía) a 37 °C durante 30 segundos. Una vez descongelado, el material seminal de cada macho se transfirió a un microtubo de 1,5 mL. Se dejaron los microtubos en el baño a 37 °C durante la duración del experimento (48 horas). La concentración se evaluó al descongelar con la cámara de Thoma.

La concentración espermática se calculó usando un analizador espermático asistido por ordenador (CASA. ISAS, versión 1.0, PROISER, Valencia, España). La señal de video fue adquirida por una cámara digital Basler A312F (Basler AG, Vision Technologies, Ahrensburg, Alemania) que se asocia al *software* del sistema CASA.

Para su cálculo se fijaron 5 μ L de muestra con 5 μ L de glutaraldehído al 2%. Se pasaron 5 μ L a una cámara Makler. Se capturaron tres imágenes, que fueron corregidas (se eliminaron las partículas no espermáticas), obteniendo la concentración de la muestra original.

3.6 Inseminación artificial y obtención de datos de la fertilidad.

ASCOL (Asturiana de Control Lechero S.Coop.) nos cedió los datos de la fertilidad del macho Alino (*Tabla 15*), con dosis espermáticas sexadas y no sexadas.

La inseminación con dosis de semen sexado se llevó a cabo en rebaños con una buena fertilidad y en novillas y vacas de primer parto. Se inseminó a cada una de las hembras con una pajuela de 0,25 mL que contenía $2,1 \times 10^6$ espermatozoides portadores del cromosoma X. La inseminación con dosis no sexadas se llevó a cabo en las granjas que demandaron el servicio con dosis de 0,5 mL y concentración de 20×10^6 espermatozoides/mL. La deposición de las dosis fue en el cuerpo del útero. No se contó con un mismo veterinario para realizar las inseminaciones en todas las explotaciones que entraron en el estudio, por lo que hay que tener en cuenta una posible variabilidad de los resultados. La descongelación de las dosis se realizó en recipientes con agua a temperatura a aproximadamente unos 37 °C.

Tabla 15: Datos de fertilidad en campo del toro Alino.

Toro	Nº de cubriciones	Catalogables	Tasa no retorno 90d
Alino no sexado	23144	23090	41%
Alino sexado	1207	1186	32%

3.7 Valoración de la motilidad espermática.

En primer lugar y tras realizar el protocolo de descongelación descrito en el apartado 3.5, homogeneizamos el semen que estaba depositado en el tubo *Eppendorf*, y depositamos 5 μL en la cámara de recuento Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) de 10 μL de profundidad, situada en una pletina atemperada (HT200, Minitüb, Alemania) a 39 °C, quedando la muestra preparada para su análisis. Realizamos el análisis con un microscopio Nikon Eclipse E-400 (Tochigi, Japón) equipado con una óptica de contraste de fase negativo. Para la captura de las imágenes utilizamos una magnificación de 10 aumentos. La señal de video era adquirida con una cámara digital Basler A312F (Basler AG, Vision Technologies, Ahrensburg, Alemania). El *software* del sistema CASA es ISAS[®] v. 1.2 (Integrated Sperm Analysis System - Proiser R +D, Paterna, España).

Los parámetros de configuración que empleamos para todas las muestras analizadas en nuestro experimento fueron:

- Número de imágenes analizadas: 53.
- Frecuencia de adquisición: 53 imágenes/segundo.
- Tiempo de captura: 1 segundo.
- Umbral mínimo/máximo del área de las partículas para ser identificadas como espermatozoides: 25–70 μm^2 .
- 10 < lentos < 25 < medios < 45 < rápidos ($\mu\text{m}/\text{segundo}$).
- Número mínimo de imágenes en las que debe de aparecer un espermatozoide para que sea calculada su ALH: 10.
- Área: 25–60 μm^2 .

El sistema recoge la proporción de espermatozoides con motilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %), así como la cinemática. Los parámetros cinéticos que se miden son: velocidad según la trayectoria curvilínea o real (VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidad según la trayectoria suavizada o media (VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidad según la trayectoria rectilínea (VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), *wobble* o tambaleo (WOB, %), amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH, μm), frecuencia de cruce de batido (BCF, Hz) (Verstegen *et al.*, 2002).

Guardamos cuatro campos de cada una de las muestras. Esto nos permitió un análisis a posteriori de las mismas. En este análisis hicimos una revisión visual de las imágenes, y eliminamos las partículas no espermáticas, los espermatozoides erróneamente identificados como móviles/inmóviles y las trayectorias incompletas o incorrectamente trazadas tras un cruce. Concluimos que nuestra estimación de los parámetros de movilidad era fiable, puesto que capturamos más de 200 espermatozoides por muestra.

Los valores de los parámetros los guardamos en un fichero tipo *Excel*, que almacenamos para su procesado y análisis.

3.8 Análisis de las formas anormales.

Las formas anormales se analizaron empleando 10 μL de la muestra recién descongelada (tiempo 0). En primer lugar diluímos la muestra (se realizó una dilución distinta dependiendo si la muestra estaba sexada o no, debido a que estaban a diferente concentración). Después fijamos con la solución de glutaraldehído al 2%. Pasamos 5 μL de la muestra fijada, a un portaobjetos, cubriendo la gota con un cubreobjetos de 22×22 mm. Se analizaron 400 espermatozoides con una óptica de 40x en contraste de fases. Las morfoanomalías las clasificamos en una hoja de *Excel*, distinguiendo las anomalías para cada espermatozoide según Youngquist *et al.* (2007).

3.9 Viabilidad y estado del acrosoma.

Estos parámetros se evaluaron mediante citometría de flujo. Para cada prueba de tinción empleamos 150.000 espermatozoides.

En primer lugar, elaboramos la solución de tinción (“combinada nº 1”. *Anexo I. Tabla 13*).

Se añadieron X μL a los 300 μL de la solución de tinción en un tubo de citometría. Para una correcta adquisición de eventos en el citómetro se añadió de cada muestra la cantidad correspondiente, alcanzando una concentración final de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Tras alicuotar, incubamos los tubos en una estufa a 37 °C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, comenzamos con el análisis en el citómetro.

Las muestras las analizamos con un citómetro de flujo CyAn-ADP (Beckman-Coulter, Fullerton, California. EEUU), equipado con tres láseres (405 nm, 488 nm y 633 nm). Los datos fueron procesados con un *software* Weasel v.3.0.1. (*Imagen 1*).

Obtuvimos cuatro subpoblaciones diferentes (*Figura 9*): espermatozoides no viables y con acrosoma intacto (rojo), espermatozoides viables con acrosoma dañado (verde), espermatozoides no viables con acrosoma intacto (rojo y verde), espermatozoides viables con acrosoma intacto (sin teñir).



Imagen 1: (a) y (b) muestran un citómetro de flujo analizador CyAn-ADP.

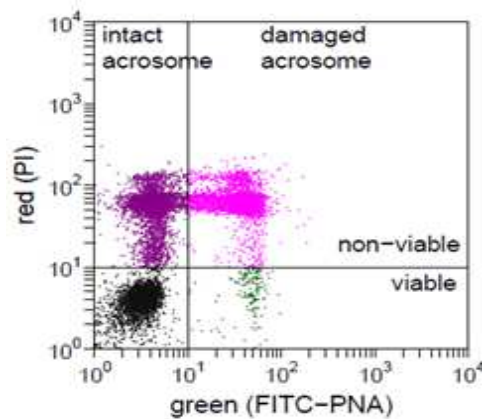


Figura 9: Subpoblaciones espermáticas obtenidas tras el empleo de los colorantes: PI y PNA-FITC.

3.10 Viabilidad y funcionalidad mitocondrial.

Preparamos la solución de tinción (“combinada nº 2”. Anexo I. Tabla 14).

Los análisis los realizamos de la misma forma que la descrita en el apartado anterior aunque empleando unas plantillas diferentes. Los datos también los procesamos con un *software* Weasel v.3.0.1. (Figuras 10 y 11).

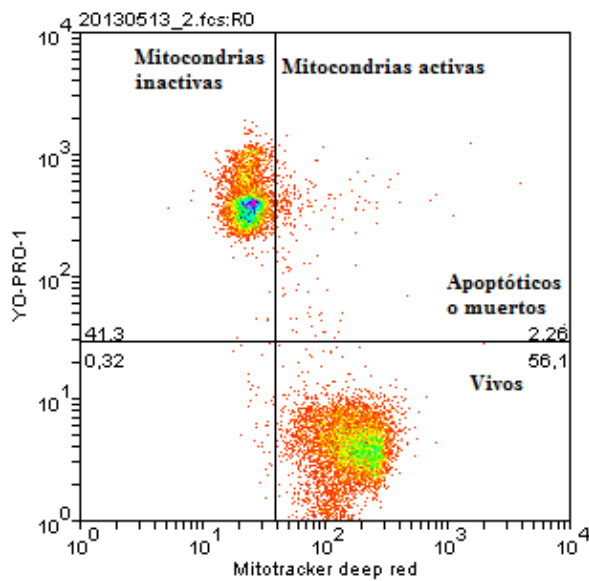


Figura 10: subpoblaciones espermáticas obtenidas tras el empleo de los colorantes YO-PRO y Mitotracker deep red.

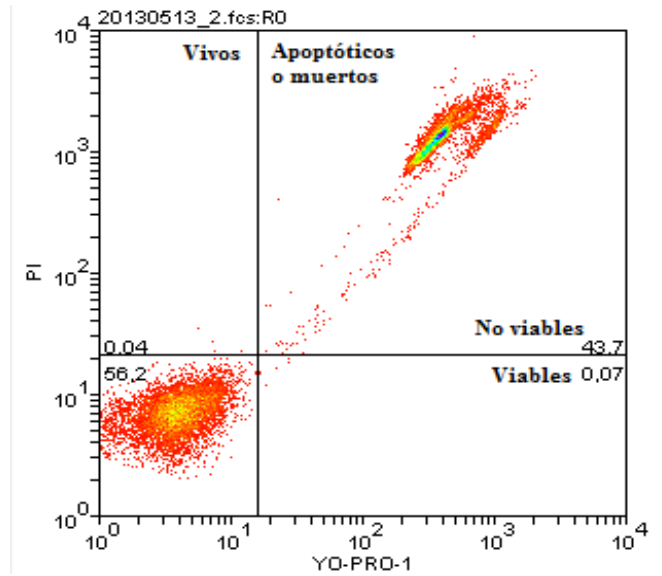


Figura 11: subpoblaciones espermáticas obtenidas tras el empleo de los colorantes PI y YO-PRO.

3.11 Valoración de la estabilidad de la cromatina por el método SCSA.

La técnica SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) se basa en la resistencia a la desnaturalización del ADN (supuestamente menor si hay roturas en la hebra) y en las propiedades del colorante metacromático naranja de acridina (verde si se une a ADN de doble cadena y rojo si se une a ADN de cadena sencilla) (Evenson *et al.*, 1980).

En primer lugar calculamos la concentración de cada muestra. Una vez obtuvimos ese dato, separamos la cantidad correspondiente de dosis espermática para que nos diese una concentración final de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, una vez diluido en 200 μ L de medio tamponado TNE (*Anexo I. Tabla 5*).

Cuando ya tuvimos las muestras depositadas en un tubo Eppendorf® con el TNE, las congelamos con nitrógeno líquido y las almacenamos en un congelador a -80 °C hasta que las analizamos.

Antes de comenzar con el análisis tuvimos que elaborar unas muestras estándar para crear una plantilla de adquisición en el *software* del citómetro. Las muestras estándar no estaban sexadas y pertenecían a un macho de raza de lidia que presentó una heterogeneidad de DFI (DNA Fragmentation Index) media. Preparamos estas muestras estándar como se ha descrito para las muestras a analizar y las almacenamos a -80 °C.

Antes de realizar el análisis, preparamos una caja con hielo húmedo para mantener en ella las botellas de solución detergente-ácida (*Anexo I. Tabla 6*) y la solución de tinción (*Anexo I. Tabla 7*). También ajustamos las distintas pipetas a las cantidades que íbamos a emplear. Descongelamos los *Eppendorf* que contenían las muestras y pasamos 200 μ L de cada una a tubos de citometría que colocamos en una gradilla metálica sobre el hielo húmedo.

En primer lugar, se equilibró el sistema hidráulico del citómetro mediante un tubo conteniendo tampón de equilibrado (0,4 mL de medio detergente-ácido y 1,2 mL de solución de tinción). Este tampón circula por el sistema durante 15 minutos antes de comenzar con la lectura de las muestras y entre muestras.

Para cada muestra, se adicionaron 0,4 mL de medio detergente-ácido a 200 μ L de muestras para desnaturalizar el ADN. Tras 30 segundos, teñimos las células con 1,2 mL de solución de tinción. Transcurridos tres minutos desde que añadimos esta solución,

colocamos la muestra en el citómetro (FACScalibur) para el comienzo de su análisis. Todo el proceso se realizó en hielo húmedo.

La primera muestra que se analiza es estándar, para configurar el *software*. Comenzamos la adquisición sin guardar los datos, ajustando la región de adquisición para excluir debris. Ajustamos la velocidad de flujo del citómetro a 200-250 células por segundo, y los fotodetectores FL3 y FL2 a un valor medio de 130 ± 5 y 500 ± 5 , respectivamente.

La adquisición de eventos se detiene automáticamente al llegar a 5.000 eventos en la región utilizamos para delimitar eventos espermáticos.

El diagnóstico se realiza a partir de la relación entre la fluorescencia roja y la fluorescencia total (verde + roja) de cada espermatozoide, llamando a este factor DFI (DNA Fragmentation Index) (*Figura 12*).

A partir del DFI se extraen varios parámetros (x-DFI, SD-DFI, % DFI) que permiten estimar el daño al material genético de los espermatozoides. El x-DFI es el valor medio de DFI de una muestra. SD-DFI es la desviación estándar del DFI, y está relacionado con la heterogeneidad en la muestra. El mDFI es el porcentaje de espermatozoides con el DFI mayor del 25% y menor del 50%. El hDFI es el porcentaje de espermatozoides con el DFI mayor del 50%. Evenson *et al.* (2002) establece el umbral entre el hDFI y el mDFI en un 75%, pero para semen humano. La modificación de este umbral (del 75% al 50%) es debido a las diferencias interespecíficas en la estructura de la cromatina espermática. El tDFI es la suma de hDFI y mDFI. Por último, el HDS es definido como el ADN con alta tinción (fluorescencia verde). Se trata de una medida del grado de condensación del ADN (Evenson *et al.*, 2002).

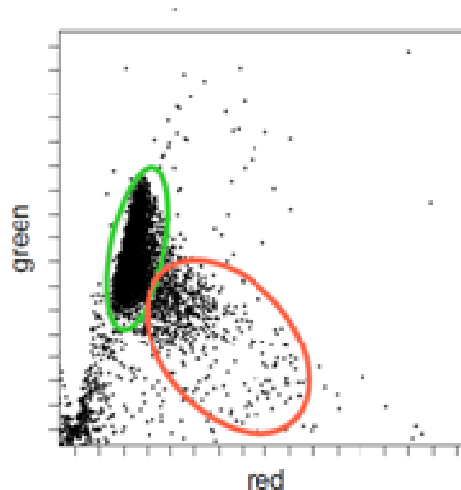


Figura 12: Citograma que muestra la fluorescencia roja y verde, recogidas por el citómetro de flujo.

Los datos son digitalizados y transferidos a un ordenador (Macintosh) provisto de un *software* de adquisición y análisis de muestras CellQuest (v. 1, Becton Dickinson). Los gráficos de adquisición y de análisis de datos del citómetro de flujo se crearon con este *software*. Para descartar del análisis las partículas que no eran espermatozoides se utilizaron las señales SSC (side-scattered light o dispersión lateral) y FSC (forward-scattered light o dispersión frontal detectada por el fotomultiplicador 1P28) de las partículas, así como el nivel de fluorescencia (descartando los eventos no fluorescentes).

3.12 Análisis de los datos.

El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico R (v. 3) (<http://www.r-project.org>). A partir de los datos del CASA y de citometría se obtuvieron las distintas variables utilizadas en el estudio, así como sus valores descriptivos. Debido a la falta de muestras de referencia (no sexadas), así como la falta de replicados dentro de cada macho, se optó por un estudio preliminar descriptivo.

4. Resultados.

Este trabajo contribuye a determinar la calidad del semen sexado en la especie bovina. Para ello realizamos una serie de valoraciones y empleamos técnicas que se complementan, tales como la técnica CASA y el método SCSA.

4.1 Valoración de la motilidad espermática.

Si comenzamos evaluando la motilidad total y progresiva de cada macho (*Figura 13*), observamos diferencias claras entre los machos y entre las muestras de semen sexado y no sexado. El semen no sexado presentó unos porcentajes de movilidad mayores, especialmente tras la incubación. La motilidad del semen sexado no solo fue inferior a la de Alino no sexado, sino que descendió considerablemente tras la incubación.

Observando la disminución de la motilidad total de cada macho tras tres horas de incubación, se observa como hay un descenso más brusco en las muestras que se corresponden con semen sexado, disminuyendo hasta 30 puntos porcentuales en la muestra del macho Panley. La muestra de Courier no tuvo un descenso de motilidad tan brusco, aunque su movilidad inicial fue menor que la de Painley y Mordor. La motilidad progresiva a las tres horas descendió en proporción a como lo había hecho para la motilidad total. El ejemplo más claro de la vulnerabilidad a la incubación la presentaron las dosis de Mordor, cuya movilidad, inicialmente muy superior al resto de muestras sexadas y comparable con la no sexada en cuanto a progresiva, disminuyó hasta casi no presentar espermatozoides progresivos.

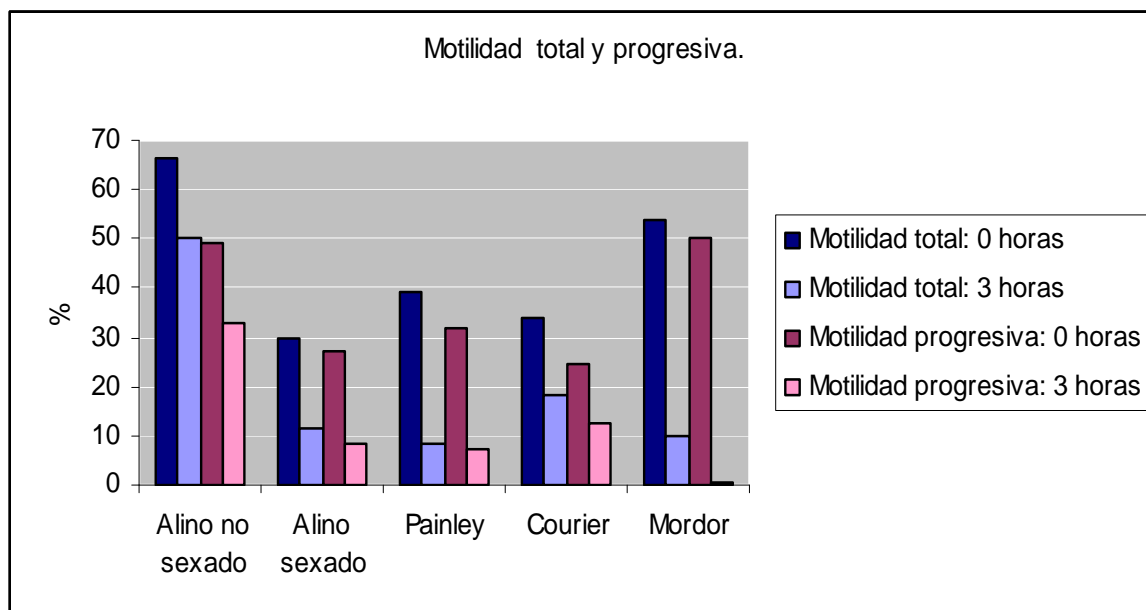


Figura 13: Porcentaje de espermatozoides con motilidad total y progresiva para los diferentes machos a las 0 y 3 horas.

En relación a los parámetros VCL, VSL, VAP y ALH (*Figura 14*) siguieron la dinámica que se describía en la motilidad total y progresiva. Evidenciándose unos valores superiores en la muestra de semen no sexado, a excepción del VSL que alcanzó un valor superior en la muestra sexada del macho Mordor.

Se especifican los valores concretos de los resultados del análisis en el *anexo II, tabla 16*.

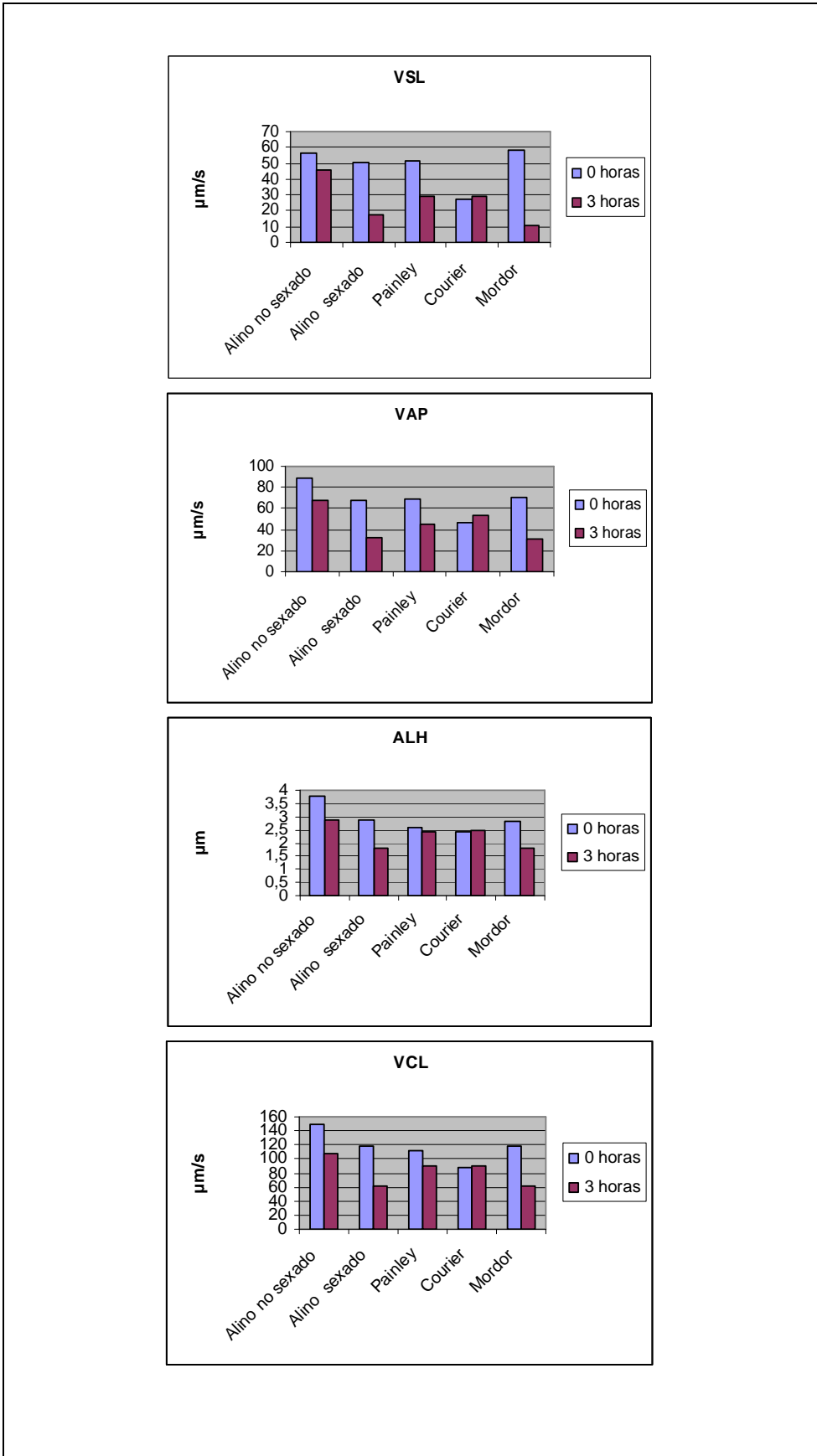


Figura 14: Parámetros VCL, VSL, VAP y ALH de los distintos machos a las 0 y 3 horas posdescongelación.

4.2 Análisis de las formas anormales.

En el análisis de formas anormales (representado en *Figura 15*), del 28,8% de espermatozoides que presentaron morfoanomalías de la dosis de semen no sexado, un 12,5% se correspondieron con anomalías de cabeza, un 12% con anomalías de pieza intermedia y un 4,3% con defectos acrosomales y de cola (*Anexo III, tabla 18*). Haciendo una comparativa con el semen sexado, observamos cómo las morfoanomalías están claramente disminuídas, no presentando ningún tipo de anomalía de cabeza, ni acrosomales, y no superando el 3,75% de morfoanomalías totales. Al contrario que en la muestra no sexada, las únicas morfoanomalías presentes en el semen sexado son las que identificamos como de pieza intermedia (doblada, inclinada), gotas (proximal y distal) y colas (enrolladas).

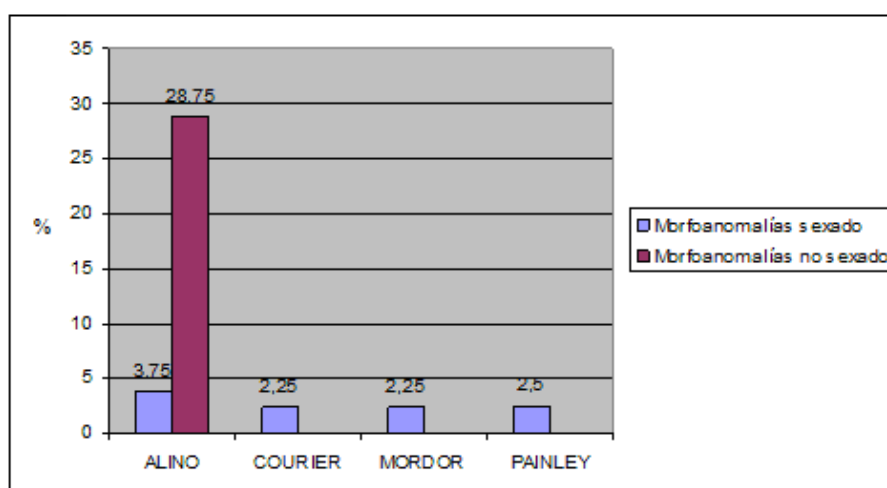


Figura 15: Porcentaje de morfoanomalías totales clasificadas por macho y evidenciando la diferencia entre semen sexado y no sexado.

Los porcentajes totales de anomalías en dosis no sexadas varían muy poco entre machos (*Figura 15*). Además, se observó que del total de espermatozoides anormales de las muestras sexadas, ninguno presentó anomalías dobles. En la muestra no sexada solo dos espermatozoides (0,5%) presentaron dos anomalías simultáneamente.

4.3 Viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad mitocondrial.

En relación a la viabilidad (proporción de espermatozoides con la membrana plasmática intacta) se observó cómo el semen sexado presentaba unos porcentajes mayores a tiempo 0. Sin embargo, la viabilidad (definida con YO-PRO-1 y PNA-FITC)

descendió de una forma muy acusada tras tres horas de incubación. La muestra seminal de Mordor fue la que experimentó un menor descenso tras la incubación. Courier fue el macho cuyos espermatozoides presentaron la peor viabilidad de las muestras sexadas a la hora 0, y la peor de las muestras sexadas y la no sexada a las 3 horas (*Figura 16*). Curiosamente, la muestra no sexada presentó una viabilidad mucho menos de la que correspondería a su movilidad (*Figura 13*). Posiblemente esta muestra sea vulnerable a la dilución en el medio de tinción, mientras que las sexadas serían más resistentes.

Si comparamos los espermatozoides viables y los viables que además presentan el acrosoma intacto, estos últimos descienden hasta un mínimo de un 15%, como se refleja en la muestra del macho Courier. El tiempo de incubación parece no afectar a la integridad del acrosoma, ya que la dinámica de disminución en comparación con la hora 0 es muy similar a la que se refleja en la gráfica en la que no tenemos en cuenta los acrosomas intactos (*Figura 17*).

Si observamos la *figura 18*, en la que se muestran los porcentajes de espermatozoides con mitocondrias activas, observamos que las dosis sexadas de Alino y Panley mantienen una dinámica similar a la *figura 17*, mientras que el resto de las dosis tienen unos valores de espermatozoides con mitocondrias activas muy bajos desde el tiempo 0. No obstante, estos valores son muy similares para todos los machos a las 3 h. La dosis no sexada partió de unos valores de mitocondrias activas muy bajos, lo cual podría ser compatible con una gran vulnerabilidad a la dilución en medio de tinción.

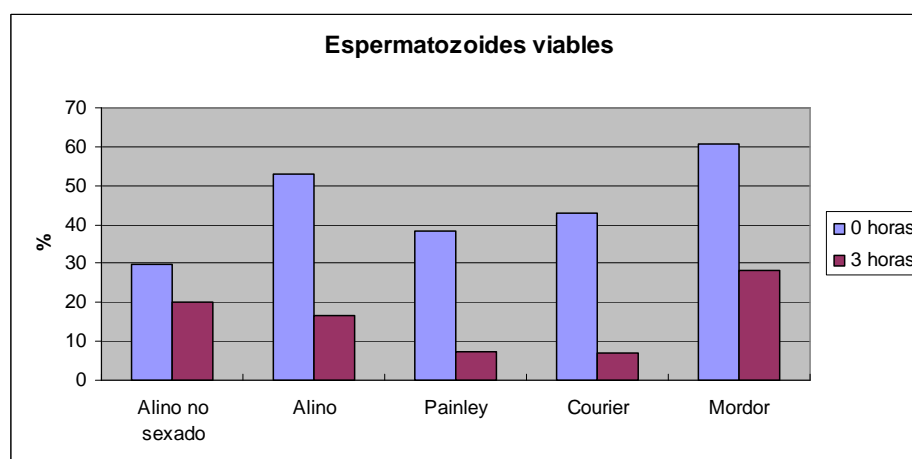


Figura 16: Porcentaje de espermatozoides viables de los diferentes machos a las 0 y 3 horas de muestreo.

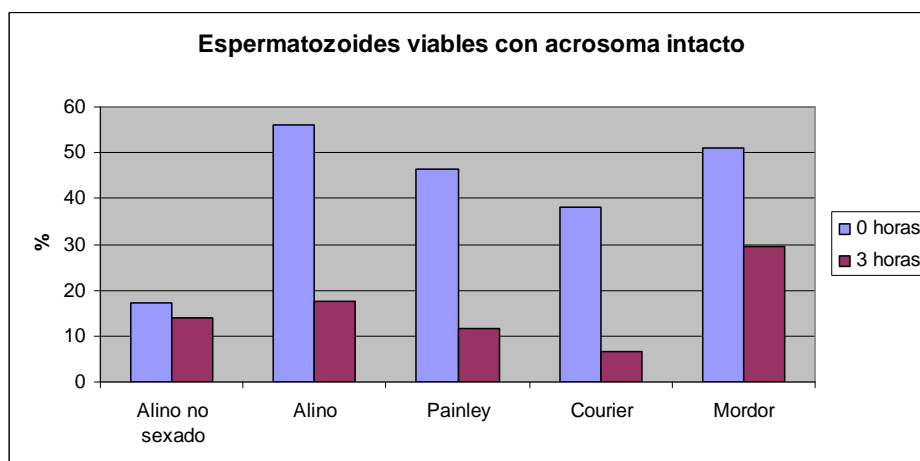


Figura 17: Porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma intacto de los diferentes machos a las 0 y 3 horas de muestreo.

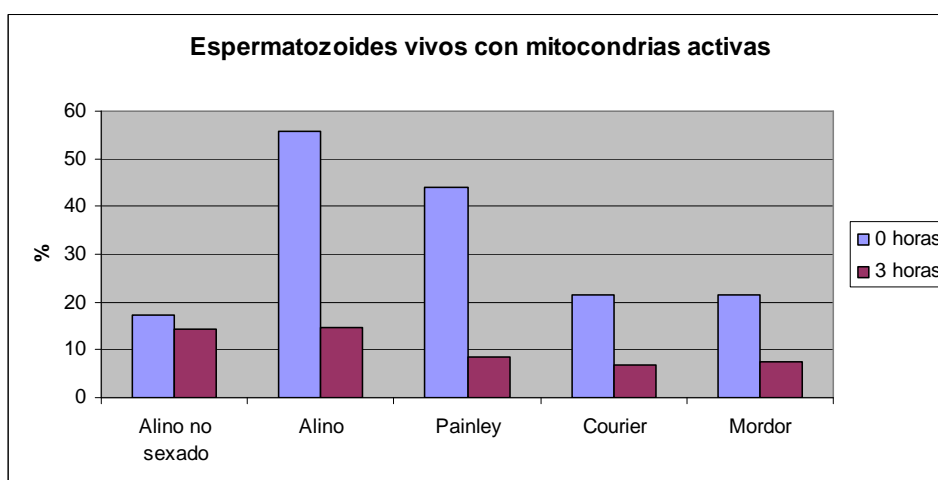


Figura 18: Porcentaje de espermatozoides vivos con mitocondrias activas de los diferentes machos a las 0 y 3 horas de muestreo.

4.4 Valoración de la estabilidad de la cromatina por el método SCSA.

Con la técnica SCSA encontramos, tal como está descrito en otros trabajos (Evenson y Jost, 2000. Evenson *et al.*, 2002), una población principal con la cromatina no alterada (incremento de la fluorescencia verde sobre la roja) a la izquierda (*Figura 19*). A la derecha de la línea diagonal de trazos observamos células fuera de esta población (COMP) con la cromatina alterada (incremento de la fluorescencia roja sobre la verde). Estas células se encontraron en mayor proporción a horas de muestreo

avanzadas, aunque varió entre machos considerablemente. Los eventos por encima de la línea horizontal son espermatozoides dentro del HDS. Tras calcular el DFI, obtuvimos un histograma típico, distinguiéndose el pico de la población principal y las células con DFI más alto formando una prolongación a la derecha.

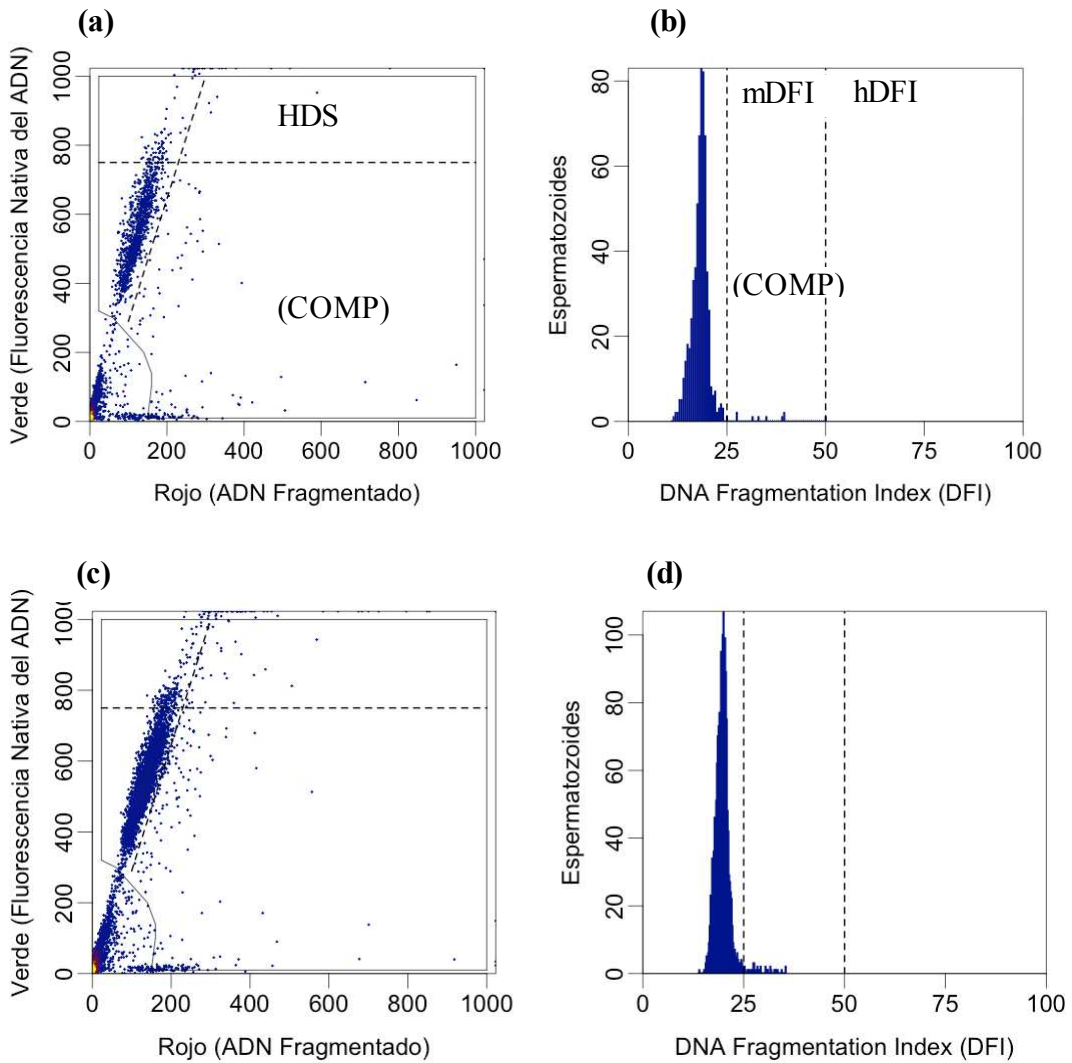


Figura 19: Valoración de la cromatina espermática por el método SCSA. El citograma (a) y el histograma (b) pertenecen a las muestras no sexadas del macho Alino (sexado) a las 0 horas. (c) y (d) pertenecen a las muestras del mismo macho a las 24 horas de incubación a 37 °C.

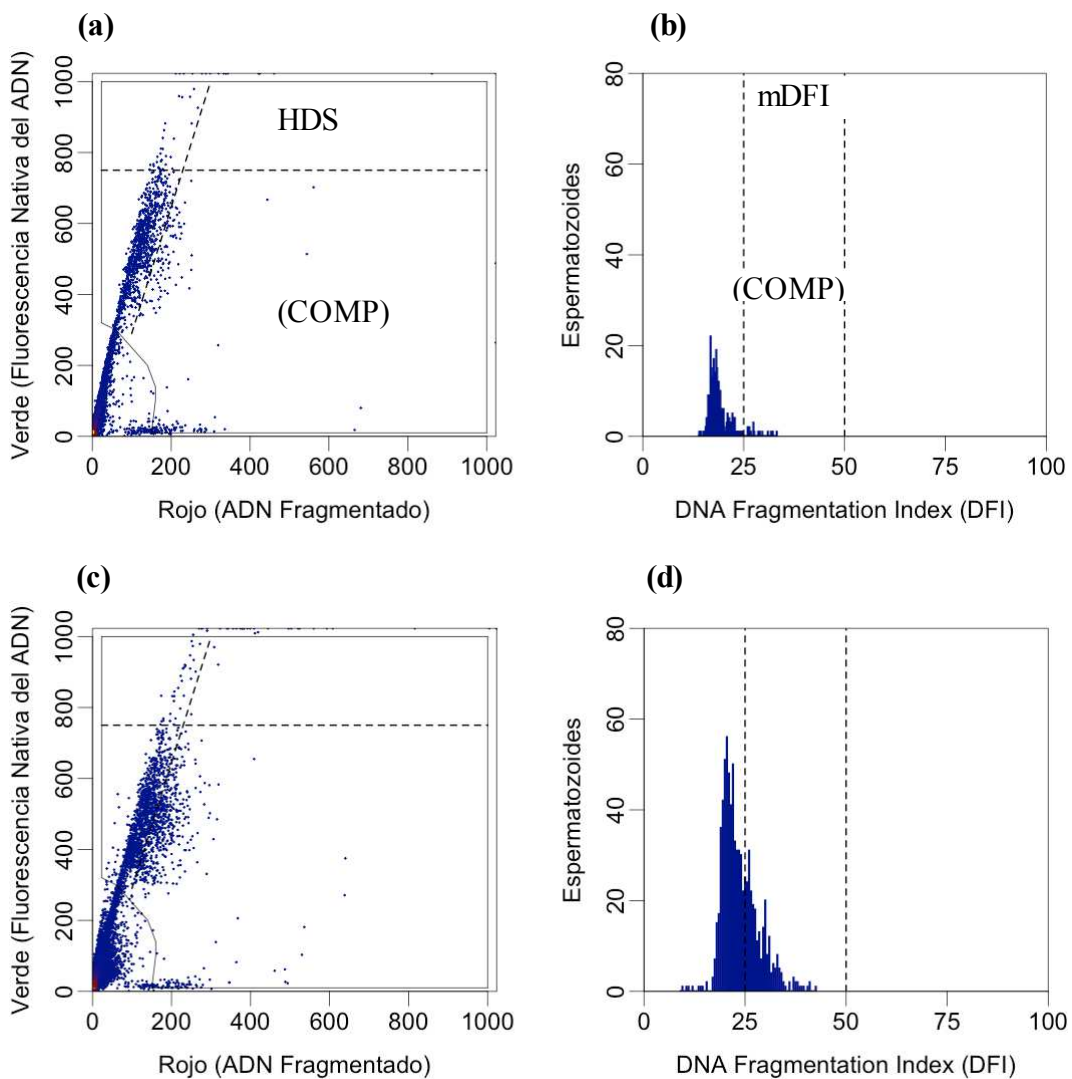


Figura 20: Valoración de la cromatina espermática por el método SCSA. El citograma (a) y el histograma (b) pertenecen a las muestras del macho Courier a las 0 horas. (c) y (d) pertenecen a las muestras del mismo macho a las 24 horas de incubación a 37 °C. Se observan unos valores de DFI mayores que en la *figura 19* (Alino).

Los parámetros x-DFI, SD-DFI, mDFI, hDFI y HDS que obtuvimos de cada uno de los machos se encuentran representados en las *figuras 21, 22, 23, 24, 25 y 26*. Como podemos observar, existe variabilidad entre los machos mostrándose distintas tendencias entre éstos. Si nos fijamos en los machos cuyas dosis seminales han sido sexadas, Courier muestra los peores resultados en el estado de la cromatina. La muestra de semen no sexada, perteneciente al macho Alino, muestra una mayor estabilidad para

los parámetros relacionados con fragmentación del ADN, siendo el daño en cromatina más uniforme en el tiempo e inferior en comparación con las dosis de semen sexado.

Los machos con un daño mayor muestran valores de xDFI más elevados (*Figura 21*). A esto suele acompañarlo un incremento en los porcentajes de SD-DFI (*Figura 22*), ya que el daño no es homogéneo en toda la población espermática. El xDFI fue mayor en las muestras de semen sexado. También se observa que el parámetro SD-DFI de la muestra sexada se incrementó considerablemente. Teniendo presente que existen diferencias entre machos, observamos cómo los espermatozoides de Painley presentan un SD-DFI superior, y cómo los de Courier, a partir de las 24 horas, presentan también una menor homogeneidad de la cromatina, en comparación con los espermatozoides sexados de Alino y Mordor.

En cuanto a la proporción de espermatozoides con un DFI entre el 25% y el 50% (mDFI), podemos observar que los porcentajes fueron muy bajos en los primeros tiempos del muestreo. Courier sufrió un importante aumento entre las 3 y 24 h entre el resto, alcanzando los porcentajes más elevados. Cerca del 25% de los espermatozoides de esa muestra mostraron niveles de DFI moderados (entre el 25% y el 50%) (*Figura 23*).

Un mínimo porcentaje de espermatozoides presentaron un índice de fragmentación elevado (mayor del 50%, hDFI). Aún así, no se alcanzó un 0,8% de espermatozoides con hDFI ni en Courier, con peores resultados de calidad espermática (*Figura 24*).

En el tDFI, representado en la *figura 25*, se representan todos los espermatozoides con un DFI mayor del 25%, por tanto, con alteraciones en la cromatina identificadas con fragmentación del ADN. Dado el bajo nivel de hDFI, su perfil es prácticamente como el de mDFI.

El HDS en nuestras muestras se encontró entre el 0% y el 10%. Este valor se incrementó con el tiempo de incubación, sobre todo entre las 24 y 48 h de incubación. La muestra de semen no sexado (Alino) destacó por presentar los mayores porcentajes, diferenciándose claramente de las muestras de semen sexado del mismo macho y, también, del resto de machos (*Figura 26*). No obstante, nunca se superó el 10% de HDS.

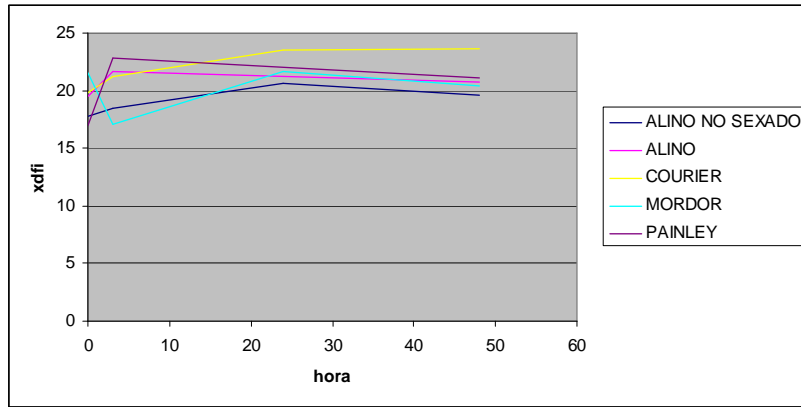


Figura 21: Representación de los valores xDFI.

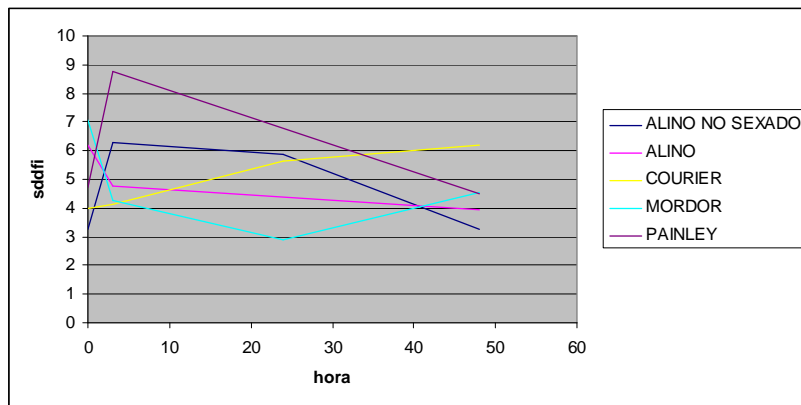


Figura 22: Representación de los valores SD-DFI (desviación estándar del DFI).

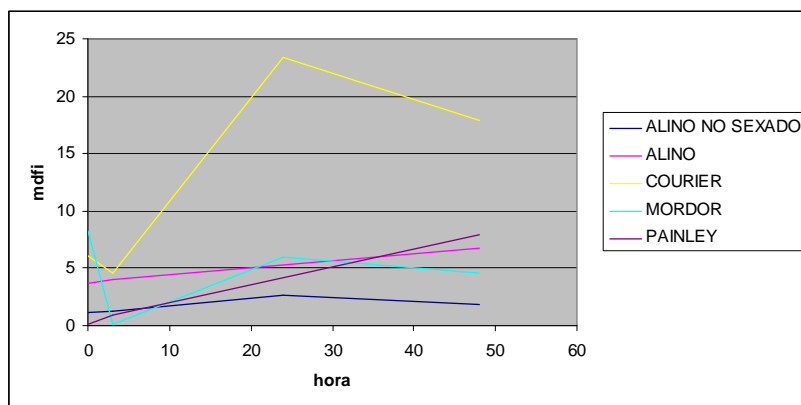


Figura 23: Representación de los valores de mDFI (Índice de fragmentación del ADN moderado, DFI entre el 25% y el 50%. expresado en porcentaje).

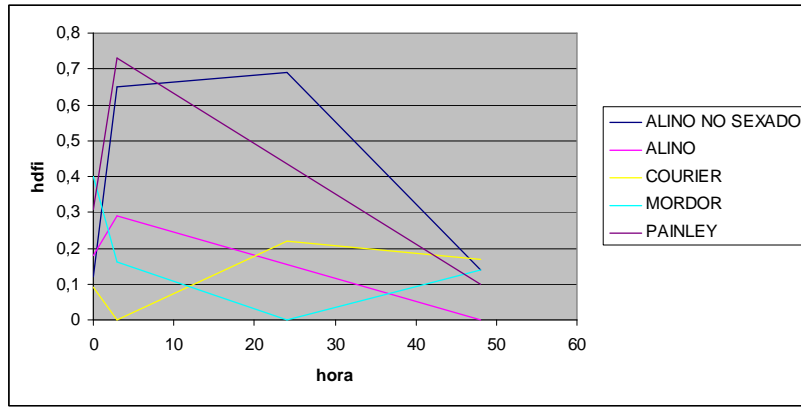


Figura 24: Representación de los valores de hDFI (Índice de fragmentación del ADN elevado, DFI mayor del 50%. expresado en porcentaje).

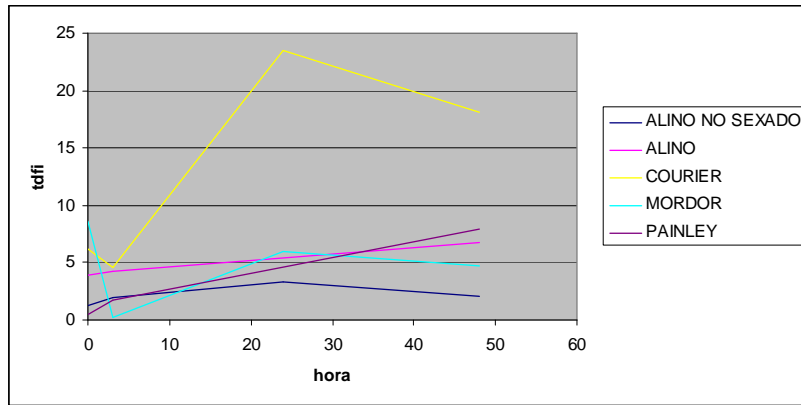


Figura 25: Representación de los valores de tDFI (mDFI+ hDFI. es decir, todos los espermatozoides con un DFI mayor del 25%. expresado en porcentaje).

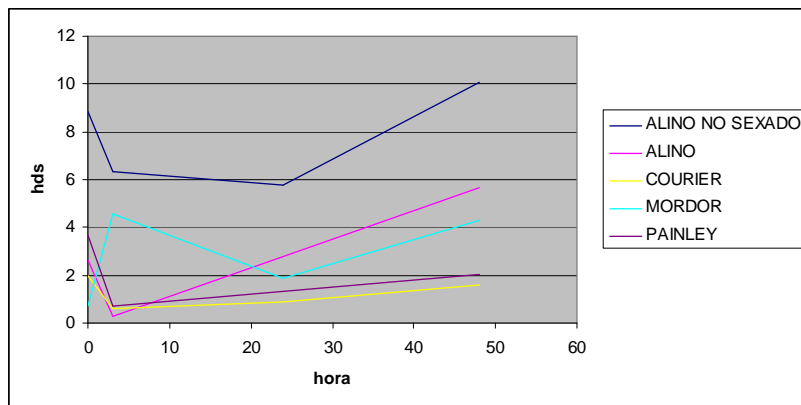


Figura 26: Representación de los valores de HDS (alto grado de tinción. expresado en porcentaje).

En la *figura 19* podemos observar un incremento en el daño de la cromatina espermática con el aumento de las horas de incubación. Lo mismo podemos observar en la *figura 20*. Se ve cómo el tiempo de incubación tiene un efecto sobre la calidad espermática. Si comparamos la *figura 19* con la *figura 20*, vemos que existe una diferencia entre los machos evidenciando que los histogramas e histogramas del primero muestran un menor nivel de daño en la cromatina. Además, se observa cómo la muestra de semen no sexado (*Figura 7*) se vio menos afectada por las 24 horas de incubación.

5. Discusión.

En este trabajo hemos realizado un análisis preliminar de dosis sexadas y sin sexar procedentes de toros que utilizaremos en futuros experimentos. El hallazgo más importante ha sido la gran variabilidad entre los machos, tanto en las muestras descongeladas como en la dinámica observada tras una incubación a 37 °C. Además, hemos observado diferencias notables entre la muestra no sexada y las sexadas. Son especialmente importantes los cambios en la integridad del ADN espermático, que tienen la potencialidad de afectar incluso a técnicas *in vitro*, donde la viabilidad o movilidad espermáticas podrían tener un papel menos crítico.

En este trabajo hemos observado que las muestras de semen sexado presentaban una mayor cantidad de restos que las muestras convencionales. Una posible explicación para esta diferencia está en el tipo de diluyente empleado. Las muestras de semen sexado contienen yema de huevo, a diferencia del semen convencional que no la contiene. El riesgo de contaminación es, además, mayor para las muestras sexadas, debido a la adición de productos de origen animal, su mayor manejo y tiempos de incubación superiores.

Los resultados de motilidad, en los que la muestra no sexada presentaba unos mayores porcentajes de espermatozoides móviles, progresivos y mejor cinemática, nos permiten proponer que esta muestra podría proporcionar mayor fertilidad. Esta muestra presentó también buenos resultados en las variables del SCSA, y aunque el HDS fue el mayor, queda muy por debajo de los valores máximos que se considera que podrían comprometer la fertilidad (15%). El mayor nivel de HDS podría deberse a una mayor heterogeneidad en esta muestra, que no ha sido sometida a separación por citometría de flujo.

Una de las observaciones más reseñables de este trabajo es el brusco descenso en la calidad del semen sexado con el tiempo. Esto parece indicarnos que las muestras sexadas son más sensibles a la incubación. En el caso de Courier, esta caída fue menor, por lo que podría tener mejor resistencia al estrés, a pesar de su peor calidad inicial.

La valoración de los porcentajes de anomalías en la morfología espermática resulta de interés, ya que cualquier anomalía, que afecte a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen, aunque la motilidad del eyaculado sea buena. Debemos, también, tener en cuenta que eyaculados con un porcentaje dentro de unos niveles aceptables no nos van a aportar información suficiente para predecir la fertilidad (Muiño *et al.*, 2005).

En cuanto a las morfoanomalías, éstas fueron notablemente bajas en el semen no sexado, lo cual ya ha sido descrito por otros autores. El proceso de sexado ejerce una selección sobre la muestra, descartando espermatozoides con formas anormales (baja viabilidad y morfometría no compatible con el proceso). Según Nöthling y Irons (2008), el límite superior de los defectos espermáticos que pueden ser tolerados se encuentra en un rango de entre el 15% y el 20% para los defectos de cabeza. Los defectos acrosomales y de cola se encuentran en torno al 25% y, al menos, un 70% de los espermatozoides deberían ser normales. En nuestro experimento ninguno de los machos supera estos límites establecidos, incluyendo la muestra no sexada. Por lo tanto, podemos afirmar que no tienen comprometida su fertilidad debido a unos elevados porcentajes de morfoanomalías.

Gosálvez *et al.* (2011) demostró que el semen con un incremento en el porcentaje de morfoanomalías tenía un mayor grado de fragmentación del ADN asociado. La principal hipótesis era que, durante el sexado, el nivel de daño en el ADN decrece en la fracción recogida para ser usada en inseminación, ya que el método de separación espermática elimina los espermatozoides no viables y no orientados. En nuestro caso, tal como hemos comentado, el sexado parece eliminar las morfoanomalías (Alino sexado vs. no sexado). No obstante, las morfoanomalías detectadas en la muestra no sexada (más de un 12% de cabeza) no se correspondieron con mayores niveles de daño en ADN, que fueron especialmente bajos en esta muestra no sexada. Los defectos de cabeza encontrados son poco preocupantes, con pocas anomalías relacionadas con alteraciones en la cromatina (piriformes, vacuolas nucleares).

Otra razón para que el semen con menor daño corresponda al semen sin sexar es que las dosis de no sexado pueden tener una mala calidad de base, de forma que la propia empresa que comercializa estas dosis descarte las peores. Así, globalmente va a haber un menor porcentaje de morfoanomalías en estas. Y aunque en el semen sexado la separación espermática descarte muchos de los espermatozoides con morfoanomalías porque no son capaces de orientarse en la columna de flujo del citómetro, estos seguirán teniendo un porcentaje mayor.

La criopreservación y el proceso de sexado afectan al estado de la membrana plasmática de distintas maneras: choque frío, desorganización de dominios, pérdida de componentes, peroxidación, daños mecánicos, etc. Los espermatozoides pueden resistir estos daños, pero la membrana puede quedar alterada, siendo más sensibles a daños subsecuentes. Mordor no sólo obtuvo los mejores resultados de viabilidad tras la descongelación, sino también tras la incubación. La composición y resistencia de la membrana es afectada por factores genéticos y ambientales (alimentación, etc.). Dado que los toros se mantienen en condiciones similares y controladas, los resultados sugieren diferencias genéticas entre los machos, que serían objeto de futuros estudios.

Vogler *et al.* (1993) demostró que los toros con mayor porcentaje de fertilidad tenían una mayor viabilidad espermática y una menor incidencia de espermatozoides morfológicamente anormales. Al parecer esta afirmación no se corresponde con los datos que obtenemos en nuestro experimento. Sin embargo, en el caso del semen sexado debemos tener en cuenta que hay una baja concentración de espermatozoides contenidos en la pajuela por lo que podemos pensar que la fertilidad con dosis mayores sería superior.

Un hecho destacable fue que, tan solo, un mínimo porcentaje de espermatozoides presentaron un índice de fragmentación elevado (mayor del 50%, hDFI). Hay que recordar que rebajamos el límite al considerar a un espermatozoide como hDFI (de 75% en humano a 50%). Aún así, no se alcanzó un 0,8% de espermatozoides con hDFI en ningún caso (*Figura 24*), indicando que aunque se presenten alteraciones en la cromatina, éstas no parecen ser excesivamente graves.

Conviene resaltar que el xDFI fue mayor en las muestras de semen sexado. El parámetro SD-DFI de la muestra sexada se incrementó considerablemente en comparación con lo que cabría esperar siendo, entonces, indicativo de que el semen sexado presenta una cromatina espermática menos homogénea que el semen no sexado

en general, puesto debemos tener presentes las diferencias intermacho. Teniendo presente que existen diferencias entre machos, observamos cómo Painley presenta un SD-DFI superior llegando a subir a casi un 8% a las 3 horas de incubación. Courier, a partir de las 24 horas, presenta también una menor homogeneidad de la cromatina, en comparación con Alino sexado. Sería de interés observar esto con un número superior de machos, y con disponibilidad de dosis de semen no sexado de todos los machos incluidos en el estudio.

El HDS es una variable que depende del grado de compactación de la cromatina, estando relacionada con la madurez espermática. Las muestras no sexadas de Alino alcanzaron niveles muy superiores a las muestras sexadas, posiblemente porque el procedimiento de sexado elimina estos espermatozoides (diferencias en morfología o viabilidad). De todas maneras, los niveles de HDS alcanzados quedan lejos de los que se consideran preocupantes para la fertilidad (15%).

Hay estudios como el de Arruda *et al.* (2012) que demuestran que el semen sexado mantiene niveles bajos de fragmentación durante las primeras 24 horas de incubación, para después experimentar un ligero incremento, produciéndose el daño en el ADN entre las 24 y 48 horas. El tiempo que escogimos, por tanto, para el último muestreo fue de 48 horas. Si tenemos en cuenta el grado de compactación de la cromatina, evidenciamos un incremento a partir de las 24 horas de incubación, lo cual llevaría a poder establecer la hipótesis de que tras un tiempo de incubación, la cromatina pierde estabilidad y se vuelve más laxa, pudiendo esto, tener un efecto negativo sobre los porcentajes de fertilidad en campo.

Ballachey *et al.* (1987) demostró que la mala condición de los espermatozoides medida mediante el SD-DFI estaba relacionada la fertilidad. Boe-Hansen *et al.* (2005) mostró que el DFI es la única variable que correlacionaba (negativamente) con la fertilidad bovina. En este trabajo, únicamente disponemos de datos de fertilidad en campo de uno de los machos (*Tabla 15, apartado 3.6*). En la misma observamos que la fertilidad desciende en 9 puntos porcentuales cuando se empleó semen sexado. Aunque debemos tener en cuenta que esta disminución se puede deber a multitud de factores como la inferior concentración de espermatozoides que se depositan en el tracto uterino de la hembra, la experiencia de cada inseminador, la granja e incluso la propia hembra, así como el proceso de sexado y el protocolo de descongelación.

Hay autores como Verstegen *et al.* (2002) que relacionan la fertilidad en campo en bovino con los resultados del test SCSA, e indican que algunos límites propuestos para el Índice de Fragmentación del ADN (DFI), identifican individuos subfértiles. Sin embargo, Bollwein *et al.* (2008) no encontró relación entre SCSA y la fertilidad en campo trabajando con semen bovino. Sería interesante realizar un estudio en campo, comprobando si, en nuestro caso, el macho Courier se trata de un toro subfértil o si, simplemente, no tiene buenas aptitudes o las tiene peores en comparación al resto, para la congelación o sexado. Debemos tener presente que machos sin una aceptable calidad del semen normalmente no son utilizados para la elaboración de dosis de semen sexado, aunque en ocasiones es más relevante conservar y difundir una genética determinada.

Debemos tener en cuenta una serie de parámetros a la hora de valorar la fertilidad de un macho. Es decir, no solo la valoración seminal con técnicas de laboratorio va a determinar la fertilidad final del toro. Es importante saber que a los ganaderos que tienen una mala fertilidad de rebaño no se les aconseja emplear semen sexado. sí a los que tienen datos de buenas fertilidades porque, en comparación con el semen sexado, la fertilidad disminuye. También es relevante el hecho de que las inseminaciones con semen sexado se realizan en novillas y en hembras de primer parto para así obtener unos resultados de fertilidad no muy inferiores en comparación con el semen no sexado.

6. Conclusiones.

Teniendo en cuenta las condiciones experimentales en que se desarrolló el presente Trabajo Fin de Máster, y considerando los resultados obtenidos se pueden extraer una serie de conclusiones:

1. En general, las dosis sexadas que se han analizado tienen buena calidad a la descongelación. El estado del ADN espermático y la proporción de formas anormales son buenos, aunque los resultados de movilidad fueron variables y, en muchos casos, mejorables.
2. Se ha observado una gran variabilidad en los resultados tras incubar las muestras sexadas descongeladas, siendo de destacar los resultados de la integridad de la cromatina espermática. Estos resultados sugieren una variabilidad intrínseca a los machos, que podría ser objeto de futuros estudios.

3. La comparación con una dosis no sexada ha mostrado que las dosis sexadas podrían ser más vulnerables a la incubación. Al contrario, las dosis sexadas contienen menos espermatozoides con defectos morfológicos. No obstante, estos defectos se mantuvieron siempre por debajo de los niveles críticos.
4. La proporción de espermatozoides inmaduros podría ser menor en las dosis sexadas, posiblemente porque son eliminados en el proceso. Este resultado es especialmente importante, y será comprobado en futuros estudios.

7. Referencias bibliográficas.

Al-katanani, Y.M., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Krininger, C.E., Block, J., Thatcher, W.W., Hansen, P.J. (2002). Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology.*, 58:171-182

Ambrose, J.D., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Leibfried-Rutledge, M.L., Thatcher, M.-J., Kassa, T., Binelli, M., Hansen, P.J., Chenoweth, P.J., Thatcher, W.W. (1999). Efficacy of Timed Embryo Transfer with Fresh and Frozen In Vitro Produced Embryos to Increase Pregnancy Rates in Heat-Stressed Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science.*, 8: 2369-2376.

Andersson, M., Taponen, J., Kommeri, M. and Dahlbom, M. (2006). Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction in Domestic Animals.*, 41(no. 2) :95-97.

Arruda, R.P. (2000). Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotectores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). Libre docencia. Faculta de Medicina Veterinária y Zootecnia, Universidad de São Paulo, Brasil.

Arruda, R.P., Celeghini, E.C.C., Alonso, M.A., Carvalho, H.F., Lemes, K.M., Silva, D.F., Rodriguez, S.A.F., Affonso, F.J. (2012). Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen *in vivo* and *in vitro*. *Anim Reprod.*, 9 (no. 3) :345-353.

Ballachey, B.E., Hohenboken, W.D., and Evenson, D.P. (1987). Heterogeneity of Sperm Nuclear Chromatin Structure and Its Relationship to Bull Fertility. *Biol Reprod.*, 36: 915-925.

Barcelo-Fimbres M, Campos-Chillon L.F., Seidel G.E, Jr. (2011). *In vitro* fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod Domest Anim.*, 46: 495-502.

Block, J., Bonilla, L., Hansen, P.J. (2010). Efficacy of *in vitro* embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J. Dairy Sci.*, 93: 5234-5242.

Boe-Hansen, G.B., Morris, I.D., Ersbøll, A.K., Greve, T., Christensen, P. (2005). DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology.*, 63: 1789–1802.

Bollwein, H., Fuchs, I., Koess, C. (2008). Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and dna fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim.*, 43: 189-195.

Burroughs, C.A., Graham, J.K., Lenz, R.W., Seidel, G.E. (2012). Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm. *Theriogenology.*, 11. doi:pii: S0093-691X(12)00608-5. 10.1016/j.

Caballero, I., Parrilla, I., Almiñana, C., del Olmo, D., Roca, J., Martínez, EA., Vázquez, JM. (2012). Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reprod Domest Anim.*, 47 (Suppl 3) :12-21.

Carvalho, J.O., Sartori, R., Machado, G.M., Mourão, G.B., Dode, M.A.N. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology.*, 74: 1521-1530.

Cerchiaro, I., Cassandro, M., Dal Zotto, R., Carnier, P., Gallo L. (2007). A field Study on Fertility and Purity of Sex-Sorted Cattle Sperm. *Journal of Dairy Science.*, 90:2538-2542.

Cogent. [consulta: Marzo 2013] [En línea]: <http://www.cogentuk.com/other-services/sexed-semen/>

DeJarnette, J.M., Nebel, R.L., Marshall, C.E. (2009). Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology.*, 71:49–58.

DeJarnette, J.M., Nebel, R.L., Marshall, C.E. (2010). Use of flow cytometrically sex-sorted semen sexed in single and superovulating cows and heifers. 26th annual meeting A.E.T.E. – Kuopio, Finland.

Dejarnette, J.M., Leach, M.A., Nebel, R.L., Marshall, C.E., McCleary, C.R., Moreno, J.F. (2011). Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible?. *J Dairy Sci.*, 94:3477-3483.

- Donovan, G.A., Bennett, F.L., Springer, F.S.** (2003). Factors associated with first service conception in artificially inseminated nulliparous Holstein heifers. *Theriogenology.*, 60:67-75.
- Drost, M., Ambrose, J.D., Thatcher, M-J., Cantrell, C.K., Wolfsdorf, K.E., Hasler, J.F., Thatcher, W.W.** (1999). Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in florida. *Theriogenology.*, 52: 1161-1167.
- Espinosa-Cervantes, R., Córdova-Izquierdo, A.** (2012). Sexing sperm of domestic animals. *Trop Anim Health Prod.*, 25.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., and Melamed, M.R.** (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.*, 210: 1131–1133.
- Evenson, D.P., Jost, L.K.** (2000). Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science.*, 22: 169–189.
- Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K.** (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, 23: 25–43.
- Faezah, S.S., Zuraina, F.M., Farah, J.H., Khairu, I.O., Hilwani, N.I., Iswadi, M.I., Fang, C.N., Zawawi, I., Abas, O.M., Fatimah, S.I.** (2012). The effects of magnetic separation on cryopreserved bovine spermatozoa motility, viability and cryo-capacitacion status. *Zygote. Dec.*, 14:1-9.
- Fraser, L., Strzeżek, J.** (2007). Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing?. *Theriogenology.*, 68: 248–257.
- Frijters, A.C.J., Mullaart, E., Roelofs, R.M.G., van Hoorne, R.P., Moreno, J.F., Moreno, O., Merton, J.S.** (2009). What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process?. *Theriogenology.*, 71: 64–67.
- Garner, D.L., Gledhill B.L., Pinked, D., Lake, S., Stephenson, D., Van Dilla, M.A., et al.** (1983). Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod.*, 28: 312-321.
- Garner, D.L.** (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology.*, 65:943–957.
- Garner, D.L., Seidel Jr., G.E.** (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology.*, 69: 886–895.
- Garner, D.L.** (2009). Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology.*, 71:11-21.

Gosálvez, J., Ramirez, M.A., López-Fernández, C., Crespo, F., Evans, K.M., Kjelland, M.E., Moreno J.F. (2011). Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology.*, 75: 197–205

Graaf, S.P., Beilby, K.H., Underwood, S.L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (2009). Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. *Theriogenology.*, 71: 89–97.

Guthrie, HD., Johnson, LA., Garrett, WM., Welch, GR. y Dobrinsky, JR. (2002). Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine. *Molecular Reproduction Development.*, 6: 87-92.

Hansen, P.J. (2007). Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology.*, 68: 242-249.

Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A., Aoyagi, Y. (2009). Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology.*, 71:68-73.

Johnson L.A., Welch, G.R. (1999). Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology.*, 52:1323-1341.

Karabinus, D.S. (2009). Flow cytometric sorting of human sperm: MicroSort clinical trial update. *Theriogenology.*, 71:74–79.

Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., Kadirvel, G. (2011). Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System – A Review. *Reprod Dom Anim.*, 46: 165-172.

Leahy T, de Graaf S.P. (2012). Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reprod Domest Anim.*, 47 (Suppl 4):207-13.

Martínez-Pastor, F. Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., DePaz, P. (2010). Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals.*, 45(Suppl. 2) :67–78.

Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology.*, 52:1353-1362.

Maxwell, W.M.C., Evans, G., Hollinshead, F.K., Bathgate, R., Graaf, S.P., Eriksson, B.M., Gillan, L., Morton, K.M., O'Brien, J.K. (2004). Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science.*, 82–83:79–95.

Maxwell, W.M.C., Evans, G. (2006). Current status and future prospects for reproductive technologies in small ruminants. *Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet.*, 18:287-295.

McKenzie, F., Faulds, K. y Graham, D. (2008). LNA functionalized gold nanoparticles as probes for double stranded DNA through triplex formation. *Chemical*

Mejía, A. (2010). Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinária y Zootecnia. Universidad de São Paulo, Brasil.

Mocé, E., Graham, J.K., Schenk, J.L. (2006). Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology.*, 66:929–936.

Moench-Tegeder, G. (2011). Effect of different ejaculate treatments on viability and fertilizing capacity of sex sorted bull spermatozoa. Tesis doctoral, Fac Agri Sci, Univ. Goettingen, Germany.

Norman, H. D., Hutchison, J. L., Miller, R. H. (2010). Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science.*, 93 (No. 8) :3880-3890.

Nöthling, J.O., Irons, P.C. (2008). A simple multidimensional system for the recording and interpretation of sperm morphology in Bulls. *Theriogenology.*, 69: 603–611.

Oses, M.V., Teruel, M.T., Cabodevila, J.A. (2009). Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *Rev. vet.*, 20: (2)138–14.

Rath, D., Barcikowski, S., de Graaf, S., y col. (2013). Sex selection of sperm in farm animals: Status report and developmental prospects. *Reproduction.*, 8;145(1):R15-30.

Rodriguez-Martínez, H., Larsson, B., Zhang, B.R., Söderquist, L. (1997). In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J Reprod. Dev.*, 43: 1-11.

Schenk, J.L., Suh, T.K., Cran, D.G., Seidel, G.E. (1999). Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology.*, 52: 1375-1 391.

Schenk, J.L., Brink, Z. and Suh, T.K. (2005). Use of competitive fertilization to evaluate a simple laser flow cytometric sexing of bovine sperm. *Reproduction, Fertility and Development.*, 17:306.

Schenk, J.L., Suh, T.K., Seidel, G.E. Jr. (2006). Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology.*, 65:299–307.

Schenk, J.L., Seidel, G.E. Jr. (2007). Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed spermatozoa: effects of laser intensity, staining conditions and catalase. *Society for Reproduction and Fertility Supplement.*, 64:165-177.

Schenk, J.L., Cran, D.G., Everet,t R.W., Seidel, G.E., Jr. (2009). Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per

inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology.*, 71:717-728.

Schrand, A.M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Smith, D.A. y Syed, A.F. (2010). Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Nanomedicine Nanobiotechnology.*, 2:544-568.

Seidel, G.E. Jr., Schenk, J.L., Herickhoff, L.A., Doyle, S.P., Brink, Z., Green, R.D., Ran, D.G. Cran. (1999). Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology.*, 52:1407-1420.

Seidel, G.E. Jr., Schenk, J.L. (2002). Field trials with sexed, frozen bovine semen. Proceedings of the 19th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction - National Association of Animal Breeders, Columbia, MO, 64-69.

Seidel, G.E. Jr. (2007). Overview of sexing sperm. *Theriogenology.*, 68: 443– 6.

Seidel, G.E. Jr., Schenk, J.L. (2008). Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science.*, 105:129–138

Sharpe, J.C., Evans, K.M. (2009). Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology.*, 71:4–10.

Seidel, G.E. Jr. (2010). Using sexed semen. Applied Reproductive Strategies Conference Proceedings. Nashville, TN.

Seidel, G.E. Jr., Nevesa, K.A.L., Souzaa, A.H., Crepaldia, G.A., Salaa, R.V. Fosadob, M., Campos Filhob, E.P., Fariac, M., Sá Filhoa, M.F., Barusellia, P.S. (2011). Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology.*, 76: 427–435

Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, SERIDA. (2009). “Memoria 2009”. [consulta: Febrero 2013] [En línea]: <http://www.serida.org/pdfs/4429.pdf>

Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R. y Sastry, M. (2000). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.*, 21:10644–10654.

Spinaci, M., Vallorani, C., Bucci, D., Tamanini, C., Galeati G. (2010). Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. *Animal Reproduction Science.*, 122(1-2):58-65.

Stewart, B.M., Block, J., Morelli, P., Navarette, A.E., Amstalden, M., Bonilla, L., Hansen, P.J., Bilby, T.R. (2011). Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. *J. Dairy Sci.*, 94: 3437–3445.

Taylor, U., Barchanski, A., Garrels, W., Klein, S., Kues, W., Barcikowski, S. y Rath, D. (2012). Toxicity of gold nanoparticles on somatic and reproductive cells. *Advances in Experimental Medicine & Biology.*, 733:125-33.

Tominaga, K. (2004). Cryopreservation and sexing of *In vivo*- and *In vitro*- Produced Bovine Embryos for Their Practical Use. *J. Reprod. Dev.*, 50: 29-38.

Trans Ova Genetics. (2013). "Sexed semen guide (Uses in ET & IVF)". [consulta: Febrero 2013] [En línea]: <http://transova.com/sexed-semen.html>

Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, J.N., Muñoz, M., Moreno, J., Carrocera, S., Martín, D., Diez, C. (2012). *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology.*, 78:1465–1475.

Underwood, S.L., Bathgate, R., Maxwell, W.M.C., Evans, G. (2009). *In vitro* characteristics of frozen-thawed, sex-sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 37 °C. *Theriogenology.*, 72:1001-1008.

Underwood S.L, Bathgate R, Maxwell W.M.C & Evans G. (2010). Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen thawed bull sperm. *Animal Reproduction Science.*, 118:171-175.

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. (2002). Computer Assisted semen analyzers in Andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.*, 57: 149-179.

Vogler, C.J., Bame, J.H., DeJamette, J.M., McGilliard, M.L., Saackea, R.G. (1993). Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology.*, 40: 1207-1 219.

Waterhouse KE, Haugan T, Kommisrud E, Tverdal A, Flatberg G, Farstad W, Evenson DP, De Angelis PM. (2006). Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian red bulls. *Reprod Fertil Dev.*, 18: 781–788.

Xia C, Xia W, Yang S, An L, Li X, Wu Z, Zhang J, Wang Z, Tian J. (2012). Effect of antioxidant supplementation on function and fertility of sex-sorted boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*, 136 (1-2):108-114.

Xu, J., Guo, Z., Su, L., Nedambale, T.L., Zhang, J., Schenk, J., Moreno, J.F., Dinnyés, A., Ji, W., Tian, X.C., Yang, X., Du, F. (2006). Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. *J Dairy Sci.*, 89: 2510-2518.

Youngquist, R.S., Threlfall, W.R. (2007). Current Therapy in Large Animal Theriogenology (cap. 31). 2nd edition. Saunders, Missouri. P: 236-239.

ANEXO I: Reactivos utilizados para la elaboración de soluciones y medios.

Tabla 4: Glutaraldehído al 2 %. De la solución anterior tomamos 92 ml y le adicionamos 8 ml de Glutaraldehído al 25% (Sigma G6257). La solución una vez preparada se almacenó a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Reactivo	Concentración final (mM si no se indica otra unidad)
Glucosa (Sigma G8270)	0,16
Citrato de sodio (Sigma C0909)	0,03
Bicarbonato de sodio (Sigma S5761)	0,02
Agua Milli Q	diluyente

Tabla 5: Stock 10X de TNE (Tris/ NaCl/EDTA). Se diluye 10 veces antes de su uso.

Reactivo	Concentración final (mM si no se indica otra unidad)
Tris- HCl (Sigma T5941)	100
NaCl (Sigma S9625)	1,5 M
EDTA disódico (Sigma E1644)	10
Agua Milli Q	diluyente

Se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 2 N.

Tabla 6: Medio detergente-ácido para SCSA.

Reactivo	Concentración final (mM si no se indica otra unidad)
NaCl (Sigma S9625)	150
Triton X- 100 (Sigma T9284)	0,1% v/v
HCl 2 N (Sigma H1758)	80
Agua Milli Q	diluyente
Se ajusta el pH a 1,2.	

Tabla 7: Solución de tinción para SCSA. Se ajusta el pH a 6 con NaOH concentrado.

Reactivo	Concentración final (mM si no se indica otra unidad)
NaCl (Sigma S9625)	150
Ácido cítrico (Sigma C0759)	100
Na ₂ HPO ₄ (Sigma S0876)	200
EDTA disódico (Sigma E6635)	1
Naranja de acridina alta pureza Polysciences (Acridine orange, CI 46005 en solución a 1 mg/mL en H ₂ O)	0,02
Agua Milli Q	diluyente
Se ajusta el pH a 6.	

Tabla 8: Solución stock de PNA-FITC. Se conserva a -20 °C en oscuridad.

Reactivo	Concentración final (mM si no se indica otra unidad)
PNA-FITC (Sigma L7381)	1 mg/ml
PBS (Sigma P4244)	diluyente

Tabla 9: Solución stock de Ioduro de Propidio.

Reactivo	Concentración final (Mm si no se indica otra unidad)
Ioduro de Propidio (Sigma P4170)	1,5 mM
Suero Salino Fisiológico (Fresenius Kabi 710145)	diluyente

Tabla 10: Solución stock de Mitotracker deep red.

Reactivo	Concentración final (Mm si no se indica otra unidad)
Mitotracker deep red (Invitrogen M22426)	1 mM
DMSO (Sigma D5879)	C.S.

Tabla 11: Solución stock de YO-PRO-1.

Reactivo	Concentración final (Mm si no se indica otra unidad)
YO-PRO-1 (Invitrogen Y3603)	1 mM
DMSO (Sigma D5879)	

Tabla 12: Solución stock de Hoechst 33342.

Reactivo	Concentración final (Mm si no se indica otra unidad)
Hoechst 33342 (H3570)	8,9 mM
PBS (Sigma P4244)	C.S.

Tabla 13: Solución de tinción combinada n° 1 (Ioduro de Propidio/ PNA-FITC/ Hoechst 33342).

Reactivo	Concentración final (Mm si no se indica otra unidad)
Ioduro de Propidio (Sigma P4170)	1,5 μ M
PNA-FITC (Sigma L7381)	1 μ g/mL
Hoechst 33342 (H3570)	4,5 μ M

Tabla 14: Solución de tinción combinada n° 2 (Ioduro de Propidio/ Mitotracker deep red/ YO-PRO-1/ Hoechst 33342).

Reactivo	Concentración final (Mm si no se indica otra unidad)
Ioduro de Propidio (Sigma P4170)	1,5 μ M
Mitotracker deep red (Invitrogen M22426)	100 nM
YO-PRO-1 (Invitrogen Y3603)	100 nM
Hoechst 33342 (H3570)	4,5 μ M

Las soluciones stock de PNA-FITC, Ioduro de Propidio, YO-PRO-1 y Hoechst 33342, una vez preparadas las alicuotamos en fracciones de 1 mL y las almacenamos en tubos Eppendorf[®] a una temperatura de -20 °C protegidos de la luz, hasta el momento de su utilización.

Los productos químicos especificados en las soluciones de tinción combinadas números 1 y 2 fueron previamente diluidos en 10 mL de PBS, para alcanzar las concentraciones finales que se indican. Se mantienen a 5 °C y en oscuridad hasta su uso (se alicuotan en tubos de citometría).

ANEXO II: Resultados de los análisis mediante el sistema CASA.

Tabla 16: Valoración cinética de cada macho a las 0 y 3 horas posdescongelación mediante el sistema CASA.

Macho	Tiempo	MT (%)	MP (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
Alino no sexado	0 horas	66,6	49,3	148,3	56,3	88,2	3,8
	3 horas	50,3	33,1	107,6	45,3	68,2	2,9
	24 horas	0	0				
	48 horas	0	0				
Alino sexado	0 horas	30,0	27,1	118,5	51,0	67,2	2,9
	3 horas	11,5	8,4	62,3	17,1	32,9	1,8
	24 horas	0	0				
	48 horas	0	0				
Painley	0 horas	39,0	32,0	111,1	51,2	69,5	2,6
	3 horas	8,1	7,4	90,0	28,9	44,9	2,4
	24 horas	0	0				
	48 horas	0	0				
Courier	0 horas	33,8	24,6	87,9	27,3	46,9	2,4
	3 horas	18,4	12,6	90,2	29,1	54,1	2,5
	24 horas	0	0				
	48 horas	0	0				
Mordor	0 horas	53,8	49,9	117,8	58,0	70,6	2,8
	3 horas	9,9	0,3	60,7	10,9	30,8	1,8
	24 horas	0	0				
	48 horas	0	0				

ANEXO III: Resultados de análisis de formas anormales.

Tabla 18: Morfoanomalías de cada macho a las 0 horas posdescongelación. Estudio de 400 espermatozoides por muestra seminal.

		Alino no sexado	Alino sexado	Panley	Courier	Mordor
Anomalías de cabeza	Cabezas Sueltas	8	0	0	0	0
	Macrocefalia	2	0	0	0	0
	Microcefalia	7	0	0	0	0
	Piriforme	10	0	0	0	0
	Cónica	14	0	0	0	0
	Constricta	7	0	0	0	0
	Degenerada	2	0	0	0	0
	Vacuolas nucleares	1	0	0	0	0
	Total cabeza	51	0	0	0	0
Defecto acrosómico	133	0	0	0	0	
Cabezas dobles	1	0	0	0	0	
Espermatozoide decapitado	2	0	0	0	0	
Anomalías de pieza intermedia	Aplasia segmental	0	0	0	0	0
	Distribución desigual de mitocondrias	0	0	0	0	0
	Espiral mitocondrial engrosada	4	0	0	0	0
	Doblada	22	2	0	0	1
	Doble	4	0	0	0	0
	Inclinada	16	8	5	5	5
Total pieza intermedia	46	10	5	5	6	
Gotas citoplasmáticas	Proximal	5	3	4	2	0
	Distal	10	1	0	2	3
	Total gotas	15	4	4	4	3
Defectos de cola	Enrollada	9	1	0	0	1
	Doblada	6	0	0	0	0
	Doble	1	0	0	0	0
	Total defectos de cola	16	1	0	0	1
Morfoanomalías totales (%)		28,8	3,8	2,3	2,3	2,5

ANEXO IV: Resultados del análisis de viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad mitocondrial.

Tabla 17: Datos obtenidos con el citómetro de flujo CyAn-ADP (en porcentajes).

pippnan, espermatozoides no viables con acrosoma intacto ; **pippnap**, espermatozoides no viables con acrosoma dañado; **pinpnan**, espermatozoides viables con acrosoma intacto; **pinpnap**, espermatozoides viables con acrosoma dañado; **yppmtn**, espermatozoides apoptóticos o muertos con mitocondrias inactivas; **yppmtp**, espermatozoides apoptóticos o muertos con mitocondrias activas; **ypnmtn**, espermatozoides vivos con mitocondrias inactivas; **ypnmtp**, espermatozoides vivos con mitocondrias activas; **pipypn**, espermatozoides vivos con la membrana plasmática dañana; **pipypp**, espermatozoides apoptóticos o muertos con la membrana plasmática dañana; **pinypn**, espermatozoides vivos con la membrana plasmática intácteta; **pinypp**, espermatozoides apoptóticos o muertos con la membrana plasmática dañada.

Macho	Hora	pippnan	pippnap	pinpnan	pinpnap	yppmtn	yppmtp	ypnmtn	ypnmtp	pipypn	pipypp	pinypn	pinypp
Alino no sexado	0	32,96	34,29	29,89	2,86	28,81	53,38	0,49	17,31	46,19	36,45	17,36	0,00
	3	73,12	6,61	20,24	0,02	0,22	84,38	1,18	14,22	0,80	85,23	13,82	0,16
Alino	0	24,96	21,94	53,08	0,02	41,86	1,89	0,51	55,74	35,22	8,60	56,18	0,00
	3	35,19	48,10	16,53	0,17	78,69	3,51	3,06	14,74	0,07	82,36	17,49	0,09
Painley	0	51,97	9,52	38,48	0,03	47,01	5,87	3,24	43,87	0,16	53,17	46,42	0,26
	3	13,06	77,12	7,23	2,59	86,94	2,02	2,65	8,38	52,89	35,45	11,64	0,01
Courier	0	18,79	37,48	42,95	0,78	0,77	5,27	72,38	21,58	0,15	61,12	38,27	0,46
	3	21,62	70,65	7,06	0,66	0,42	92,7	0,04	6,84	0,10	93,21	6,63	0,06
Mordor	0	21,62	17,31	60,72	0,35	0,56	3,88	73,94	21,61	0,06	48,56	51,02	0,36
	3	30,49	40,60	28,07	0,84	11,28	0,46	80,62	7,64	0,08	70,16	29,39	0,37

ANEXO V: Resultados de los análisis mediante la técnica SCSA.

Tabla 18: Resultados SCSA de los diferentes machos, a diferentes horas de incubación, para los seis parámetros evaluados. xDFI, media de DFI (roja/fluorescencia roja+ verde). SD-DFI, desviación estándar de DFI. mDFI, índice de fragmentación del ADN moderado. hDFI, índice de fragmentación del ADN alto. tDFI, índice de fragmentación del DFI total (hDFI+ mDFI). HDS, alto de grado de tinción.

Macho	Hora	xDFI	SD-DFI	mDFI	hDFI	tDFI	HDS
Alino no sexado	0	17,80	3,24	1,19	0,12	1,31	8,88
	3	18,41	6,29	1,29	0,65	1,94	6,33
	24	20,63	5,87	2,64	0,69	3,33	5,78
	48	19,65	3,26	1,89	0,14	2,03	10,06
Alino	0	19,48	6,18	3,70	0,18	3,88	2,64
	3	21,65	4,76	3,96	0,29	4,25	0,29
	48	20,70	3,96	6,76	0,00	6,76	5,65
Courier	0	19,89	3,99	6,13	0,09	6,22	1,98
	3	21,27	4,14	4,53	0,00	4,53	0,62
	24	23,49	5,64	23,34	0,22	23,56	0,88
	48	23,66	6,17	17,94	0,17	18,11	1,61
Mordor	0	21,57	7,06	8,22	0,40	8,62	0,70
	3	17,03	4,27	0,08	0,16	0,24	4,58
	24	21,68	2,91	5,95	0	5,95	1,89
	48	20,47	4,52	4,54	0,14	4,68	4,32
Painley	0	17,02	4,73	0,15	0,31	0,46	3,68
	3	22,85	8,74	0,97	0,73	1,70	0,73
	48	21,05	4,51	7,86	0,10	7,96	2,02

ANEXO VI: Memoria de prácticas.

Índice.

1. Descripción del centro y de las actividades.....	1
2. Actividades llevadas a cabo y participación en proyectos experimentales.	3
2.1. Experimentos de puesta a punto del Trabajo Fin de Máster.....	3
2.2. Participación en otras líneas de trabajo.	5
2.2.1. Separación de espermatozoides porcinos mediante <i>Androcoll-PTM</i>	5
2.2.2. Extracción de ADN genómico de espermatozoides de ovino, y su cuantificación.....	7
2.2.3. Valoración de la estabilidad de la cromatina espermática de semen fresco diluido de porcino sometido a incubaciones a 15 y a 37 °C, mediante el método SCSA.	11
2.2.4. Valoración de los parámetros de motilidad de semen fresco diluido de porcino sometido a incubaciones a 15 y a 37 °C, por el método CASA.	14
3. Opinión personal.	17
4. Revisión bibliográfica.	18

1. Descripción del centro y de las actividades.

Del 4 de marzo al 7 de junio he realizado las prácticas del máster simultáneamente a la realización del Trabajo Fin de Máster. Mi estancia ha sido en la Universidad de León, en el Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) y en uno de los laboratorios del Hospital Clínico Veterinario de León. El instituto INDEGSAL está dirigido por el catedrático de Anatomía y Embriología: Dr. César A. Chamorro, y engloba a 70 investigadores del campo de la sanidad animal y la producción, que trabajan en diferentes líneas de investigación. Los objetivos del instituto incluyen la investigación básica y aplicada, el asesoramiento científico-técnico, la transferencia de tecnologías, la difusión y explotación de resultados, la promoción y cooperación con investigadores nacionales y extranjeros, la colaboración con ganaderos, instituciones públicas y privadas y empresas relacionadas con la sanidad y producción animal, tanto de animales domésticos como salvajes.

Entre las líneas de investigación que desarrollan están las relacionadas con la biotecnología de la reproducción asistida. En esta línea trabaja un grupo de investigadores con experiencia en inseminación artificial, congelación de semen, etc. en la especie ovina, así como en especies en peligro de extinción y rumiantes silvestres de interés ecológico y cinegético. Otro grupo que trabaja en este campo está especializado en la inseminación artificial y trasplante de embriones en las especies bovina y porcina, control integral de la reproducción en ganado bovino y fisiopatología de la reproducción, aditivos seminales para la mejora de la fertilidad, así como la infertilidad estacional, sobre todo del ganado porcino.



Imagen 2: Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL). Foto obtenida de: <http://www4.unileon.es/investigacion/ltiir/lti.htm>



Imagen 3: Laboratorio del Hospital Clínico Veterinario de León.

También hay un equipo de investigadores que trabaja en peces, analizando la calidad espermática y la mejora de las técnicas de congelación.

El grupo de Sanidad Animal trabaja en enfermedades respiratorias porcinas y en patologías en explotaciones aviarias, así como en enfermedades desarrolladas por virus en los rumiantes, además de enfermedades infecciosas de los peces y micosis de los animales terrestres y acuáticos. Los patólogos están especializados en procesos metabólicos energéticos que padecen los rumiantes de alta producción.

Otro grupo de expertos desarrolla su labor en torno a los residuos de fármacos en leche y la biodisponibilidad y toxicidad de compuestos de origen natural con interés industrial.

Por último, los expertos en genética trabajan en el uso de herramientas genómicas para la selección del ganado ovino, la identificación de genes con interés económico, la mejora genética de razas de ganado ovino y vacuno, la conservación de recursos genéticos animales de razas autóctonas en peligro de extinción y los sistemas de aseguramiento y gestión de la calidad y seguridad de la leche en pequeños rumiantes

En el grupo del instituto en el que yo he estado durante este periodo, están al frente en Dr. Felipe Martínez y la Dra. Vanesa Robles. En el equipo hay varios doctorandos y estudiantes de máster. El grupo cuenta con varios laboratorios, destacando los laboratorios de espermatozoología, el laboratorio de cultivos celulares y el laboratorio de biología molecular y análisis de geles. Además, comparten con otros grupos del instituto los equipos.

Durante mi estancia, estuve trabajando con ellos en diferentes líneas de trabajo que tenían abiertas.

2. Actividades llevadas a cabo y participación en proyectos experimentales.

2.1. Experimentos de puesta a punto del Trabajo Fin de Máster.

Se llevó a cabo la puesta a punto de cada uno de los experimentos descritos en el Trabajo Fín de Máster, con objeto de calcular el número mínimo de pajuelas que necesitábamos de cada macho para realizar el conjunto de los experimentos. También elaboramos las correspondientes plantillas de los citómetros de flujo y fijamos los parámetros correspondientes. Establecimos unos valores de concentración aproximados para cada macho, aunque después se valoraron, también, en el experimento final. Además, valoramos los puntos más significativos de muestreo.

En relación a la técnica SCSA determinamos que la concentración más adecuada para una correcta lectura del citómetro de flujo era de 2×10^6 espermatozoides/mL. Debido a la limitación de dosis y al reducido número de espermatozoides contenidos en cada pajuela, tuvimos que reducir esta concentración hasta $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Esta reducción comprometía el estudio, ya que nos arriesgábamos a no alcanzar el mínimo número de eventos necesarios en la citada técnica para obtener unos resultados lo suficientemente fiables y repetibles. Aún así, y puesto que el objetivo de este trabajo era iniciar una línea de investigación para la realización de una futura tesis doctoral, decidimos seguir adelante.

En cuanto a la valoración de las pruebas de viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad mitocondrial, se realizaron las combinaciones de colorantes descritas en el apartado de *Materiales y metodologías* del Trabajo Fín de Máster y se comprobó que se adquirirían correctamente los eventos, incluso empleando una concentración de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

Además, determina el punto en el cual la motilidad de nuestras muestras, tanto de espermatozoides sexados como de espermatozoides sin sexar, desciende en un 50% con respecto a la motilidad a tiempo 0 tras la descongelación. De esta forma, determinamos la hora del segundo muestreo que resultó ser a las 3 horas (*Figuras 27 y 28*). Tras analizar las dos gráficas obtenidas, decidimos realizar los muestreos de cada macho: a tiempo 0, a las 3 horas y a las 48 horas. Sin embargo, a la hora de llevar a cabo el experimento definitivo, añadimos un punto de muestreo más a las 24 horas tras la

descongelación (por motivos técnicos no se pueden mostrar los resultados de dos de los machos en este último punto de muestreo).

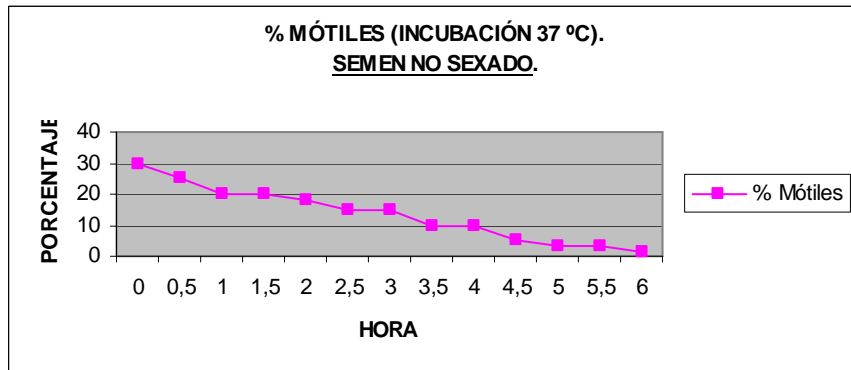


Figura 27: Reflejo del porcentaje de espermatozoides móviles durante las 6 primeras horas posdescongelación, de una dosis de semen sexado (macho Alino).

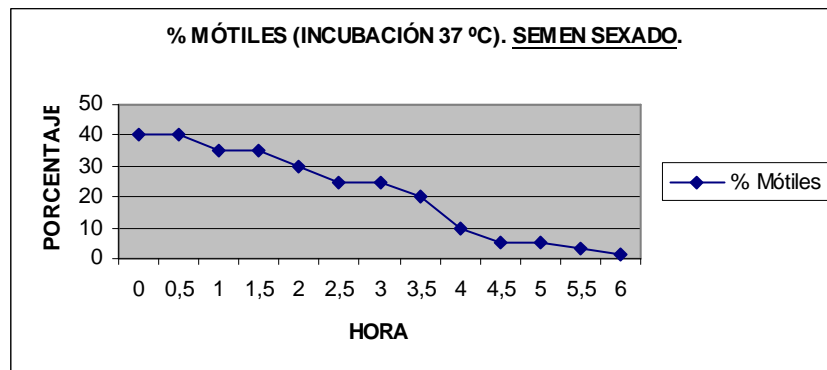


Figura 28: Reflejo del porcentaje de espermatozoides móviles durante las 6 primeras horas posdescongelación, de una dosis de semen no sexado (macho Alino).

2.2. Participación en otras líneas de trabajo.

2.2.1. Separación de espermatozoides porcinos mediante *Androcoll-PTM*.

Androcoll es un coloide que tiene la propiedad de separar los espermatozoides de buena calidad de los muertos o de inferior calidad. Hay pocos estudios que valoren los efectos beneficiosos potenciales que resultan de congelar semen seleccionado mediante dicho coloide para, después, obtener un semen de alta calidad (con mejor supervivencia e integridad del ADN), tras la descongelación.

El objetivo del experimento es determinar qué porcentaje de *Androcoll* es el más adecuado para obtener la mayor concentración de espermatozoides móviles en el pellet, para un tiempo y fuerza relativa de centrifugación (xg) dados. es decir, el impacto del gradiente de capa simple en la selección espermática.

Antes de comenzar se mezclan los espermatozoides con el coloide para comprobar que no se produce ningún choque, lo cual haría que no funcionase el experimento.

La calidad del semen tras la descongelación (12 segundos a 50 °C), inicialmente se valoró en base a sus características de motilidad y concentración espermática. Para analizar la motilidad mediante el sistema CASA se diluyen 5 µL de la muestra recién descongelada en 45 µL de MR-A[®] (dilución 1:10), para obtener una concentración aproximada de 200×10^6 espermatozoides/mL. La concentración se analiza rápidamente mediante la cámara de Thoma haciendo una dilución 1:20. También se realiza una descongelación a 37 °C durante 30 segundos, aunque se pierda calidad, con objeto de ver si se estaba produciendo un choque de temperatura o nos estaba influyendo algún otro parámetro relacionado con el proceso de descongelación.

De cada macho se descongelan 4 pajuelas simultáneamente, se mezcla su contenido en un *Eppendorf* (homogeneizar las posibles variaciones de calidad entre pajuelas), y se extraen 4 cantidades equivalentes (µL), que serán depositadas encima de las columnas de *Androcoll*. A continuación se realiza una centrifugación de 10 minutos a 300 xg. Se espera la obtención de un pellet de espermatozoides con las mejores características de motilidad del tubo, debido a que los espermatozoides de buena calidad son más densos, atraviesan el coloide y se pueden recoger como pellet. Puesto que empleamos 4 columnas con porcentajes distintos del coloide *Androcoll* (90%, 80% comercial y 80% elaborado en nuestro laboratorio, y 70%), se espera que los pellets obtenidos sean diferentes. Esto es debido a que pasan por la columna del coloide, o no,

un número determinado de espermatozoides en función del tiempo, así como de la densidad del *Androcoll*.

Una vez obtenido pellet, y después de su resuspensión en una mínima cantidad de coloide que no separamos tras alicuotar en tubos diferentes cada una de las fases obtenidas tras el centrifugado (sobrenadante, interfase, y fracción entre la interfase y el pellet), se evalúa la motilidad de los espermatozoides resuspendidos del pellet y, posteriormente, se realiza el lavado de los pellets obtenidos mediante la adición de 500 μL de medio BTS (Beltsville Thawing Solution) + BSA (Albúmina Sérica Bovina), y la centrifugación (centrífuga Microfuge[®] de Beckman-Coulter) a 300 xg, 5 minutos.

Se emplea un tiempo de centrifugación, mínimo pero suficiente, para obtener un pellet con espermatozoides de buena calidad (buenas características de motilidad). Un elevado tiempo de centrifugación llevaría a que otros espermatozoides no mótiles, pasen a formar parte del pellet, eliminando así el coloide de separación espermática.

Debido a que tuvimos problemas para la obtención de un pellet claro tras la centrifugación (la mayor parte de los espermatozoides se quedaban en la interfase), se tiene en cuenta que una elevada concentración espermática de la cantidad (μL) depositada encima de cada columna, puede hacer que los espermatozoides no atraviesen la columna de coloide, o lo hagan muy pocos. En nuestro caso cabría pensar que lo hicieron muy pocos y, por ello, llevamos a cabo una variante del planteamiento inicial del experimento. Se preparan dos columnas de coloide (porcentaje de *Androcoll* idéntico) en dos tubos *ependorf*. En el primero se añaden, a 1100 μL de *Androcoll*, 100 μL de semen sin diluir. en el segundo se añaden a 1000 μL de *Androcoll*, 200 μL de semen diluido (dilución 1:10) en BTS suplementado con BSA (proteína que corrige la aglutinación seminal). Al final obtenemos un mismo volumen que centrifugamos según el protocolo inicial (10 minutos a 300 xg).

Teniendo en cuenta el protocolo empleado y descrito en el apartado *material y métodos* de varios artículos publicados que emplean el coloide, decidimos también, probar a aumentar la columna de semen que se posiciona sobre el coloide (4 mL de coloide + 4,5 mL de semen diluido). Esta vez empleando semen refrigerado, del cual no obtendremos limitación de volumen. Además, fijamos la concentración de las muestras de semen refrigerado a 100×10^6 espermatozoides/mL.

Se analiza la motilidad y concentración, tanto de los espermatozoides seleccionados (pellet), como de los rechazados (interfase).

Se plantea realizar dos lavados y valorar si un lavado más, es o no interesante. es decir, si tras un segundo lavado se observan pérdidas en cuanto a la calidad espermática del pellet, o no y, por tanto, sería interesante lavar dos veces dicho pellet.

Por último, se procede a la incubación del pellet tras haber sido lavado a 37°C durante, al menos, 7 h, y se realizan valoraciones de la motilidad (parámetros cinéticos para cada espermatozoide móvil) mediante el sistema CASA. Dichas valoraciones se lleva realizan cada hora, incluyendo a tiempo 0. De esta forma se podrá establecer el porcentaje de *Androcoll* más adecuado para conseguir una concentración espermática de alta calidad. es decir, con qué columna logramos obtener un pellet que mantenga su capacidad fecundante el mayor tiempo posible.

Procedemos, además, a comprobar, en porcino, la hipótesis de que con semen refrigerado atraviesan el coloide un mayor número de espermatozoides formando un pellet mayor (disperso).

Hay que hacer, al menos, un triplicado de este experimento.

Es importante que durante los experimentos, se vigile la temperatura del laboratorio. Si es de menos de 20 °C, se deben mantener los tubos y muestras sobre una placa calefactada a 25 °C. También se deben atemperar los medios y el coloide (37 °C). Deberemos, además, de poner en funcionamiento la centrífuga previamente a que los *ependorf* entren en contacto con ella para, así, reducir las posibles condiciones desfavorables que alterarían la formación del pellet (muerte de espermatozoides debidos a un choque por frío).

2.2.2. Extracción de ADN genómico de espermatozoides de ovino, y su cuantificación.

He participado en un proyecto que dirigía mi tutor, el Dr. Felipe Martínez Pastor, y en el que participaba Diana García-Miranda de la Puente, licenciada en biología por la Universidad de León y cursando estudios de posgrado. La línea de trabajo la seguimos en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de León.

Comenzando con el procedimiento, el primer paso fue obtener un pellet de espermatozoides. Para ello, previamente, habíamos estimado la concentración espermática, que en nuestro caso era de 20×10^6 espermatozoides/dosis, y tomamos un volumen que contenía la cantidad de espermatozoides que luego procesamos (100 μ L). Centrifugamos a 10.000 xg, 30 segundos, eliminamos el sobrenadante, diluimos la muestra con 500 μ L de TNE y resuspendimos con vórtex. A continuación, volvimos a centrifugar, esta vez a 600 xg durante 3 minutos y, finalmente, eliminamos el sobrenadante. Para concluir con la obtención de nuestro pellet, repetimos lo descrito desde la dilución de la muestra con 500 μ L de TNE hasta la eliminación del sobrenadante.

En segundo lugar reducimos los puentes disulfuro de las protaminas y realizamos la digestión con proteinasa K. Para ello, añadimos 250 μ L de tampón Glouton al pellet, resuspendimos bien el pellet con vórtex, incubamos a 65 °C durante 1 hora, y colocamos la muestra a 37 °C. Después, añadimos 10 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) y, finalmente, incubamos durante otra hora a 37 °C.

Para realizar la extracción orgánica, añadimos 200 μ L de fenol:cloroformo al tubo con muestra (T1) y realizamos una agitación suave durante 30 segundos. A continuación centrifugamos a 10.000 xg otros 30 segundos. Después, transferimos la fase acuosa (superior) a un tubo limpio (T2) y le añadimos 200 μ L de medio TE (Tris-EDTA) al T1 para resuspender el ADN genómico tras su aislamiento. Realizamos una nueva agitación suave durante otros 30 segundos y centrifugamos, de nuevo, a 10.000 xg 30 segundos. Transferimos la fase acuosa al T2, añadimos 400 μ L de fenol:cloroformo al mismo tubo y realizamos otra agitación suave, otros 30 segundos. Después se vuelve a centrifugar a 10.000 xg 30 segundos, se transfiere la fase superior a un tubo limpio (T3), al que se añadirán 400 μ L de cloroformo. Realizamos otra agitación (suave durante 30 segundos) y centrifugamos a 10.000 xg 30 segundos para, finalmente, recuperar el sobrenadante en T4.

Para que precipite el ADN, añadimos 40 μ L de acetato de sodio 3 M (~300 mM) y 880 μ L de etanol absoluto (~70%). Mezclamos suavemente (haciendo torbellino) para mezclar las dos fases. El ADN precipitó inmediatamente, ya que es insoluble en este alcohol, y se veía como un ovillo blanco (si no hubiera sucedido así, lo habríamos dejamos entre 15 y 30 minutos a 0-4 °C, en hielo picado). Este paso, además elimina las posibles sales presentes solubles. Se recoge el ovillo de ADN con una punta de pipeta,

se pasa a medio TE (40 μL para nuestra concentración de pajueta) y, entonces, se va a resuspender el ovillo (si no se resuspende, dejar a 37 $^{\circ}\text{C}$ unas horas, con agitación suave). Por último, guardamos la solución de ADN a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta la determinación de su concentración (cuantificación).

Tras la extracción del ADN de las muestras a analizar y su dilución en agua de biología molecular para, así, permitir una correcta disolución, se cuantifica con el NanoDrop[®] ND-1000, v.3.5.2, Wilmington, USA (*Imágenes 4 y 5*). El NanoDrop[®] nos da la concentración de ADN de una muestra, registrando la absorbancia (A) a determinadas longitudes de onda (260 nM para ácidos nucleicos. 280 nM para proteínas. 230 nM para posibles contaminantes). Dado que las proteínas absorben a 280 nM, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes del ADN puro son aproximadamente de 1,8. Una absorción a 230 nM significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. Así, el cociente A_{260}/A_{280} indica pureza/presencia de contaminantes que pueden absorber luz UV (proteínas, etc.). Es deseable, por tanto, que los índices anteriores sean superiores a 1,8, indicando una concentración relativa de DNA superior a la de proteínas u otras sustancias (fenol, etc.), que podrían interferir en las técnicas de biología molecular. El cociente A_{260}/A_{230} de las muestras puras es de 2,2 aproximadamente. Las medidas que tomamos a una absorbancia de 260 nM deben leer entre 0,1 y 1,0 (con un paso de luz de 10 nM y una absorbancia de 1 unidad a 260 nM, corresponde a 50 μg de ADN por mL). Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos. De esta forma, la concentración la determinamos midiendo a 260 nM.

Después de calibrar el espectrofotómetro, añadimos 1 μL de la solución de ácidos nucleicos y el aparato nos sacó una gráfica con los datos de la absorbancia (resultados en *tabla 19*. gráfica en *imagen 5*). Con objeto de reducir los errores de pipeteado, efectuamos la medición dos veces. Se desaconsejan los valores de A_{260} inferiores a 0,02 o comprendidos entre 1 y 1,5 por el elevado margen de error que entrañan.



Imagen 4: NanoDrop®
ND-1000.

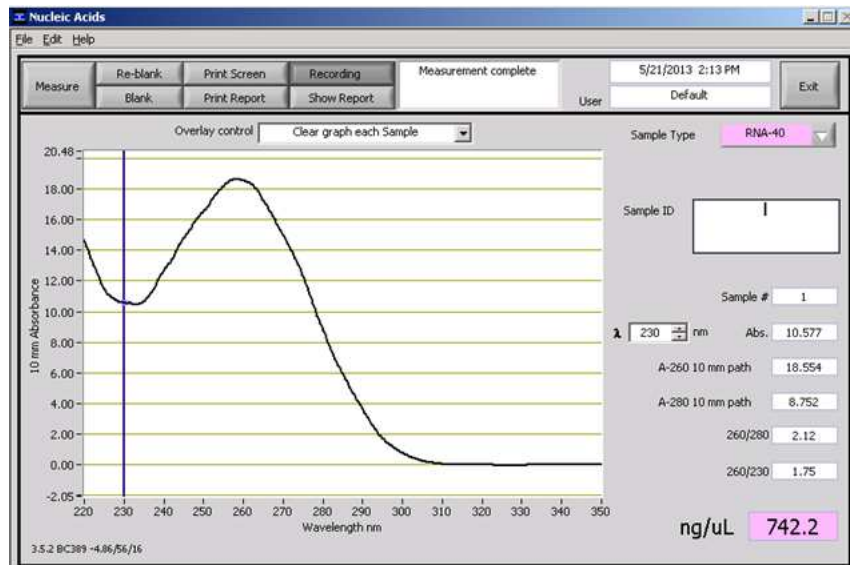


Imagen 5: Gráfica de una muestra de ADN que se obtuvo mediante el espectrofotómetro NanoDrop®.

Tabla 19: Resultados obtenidos en el NanoDrop® de dos muestras espermáticas de ovino. Las concentraciones finales las calculamos en base a los 200 μL de agua de biología molecular que añadimos a la solución de ADN.

	[ADN] inicial $\text{ng}/\mu\text{L}$	Cociente 260/280	Cociente 260/230	[ADN] final $\text{ng}/\mu\text{L}$
Muestra A	250,6	1,92	2,31	83,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$
Muestra B	330,3	1,85	2,10	110,1 $\text{ng}/\mu\text{L}$

Elaboramos la solución de trabajo realizando una dilución 1:10 la muestra original la conservamos hasta su utilización, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que no sufra daños.

Finalmente, corrimos un gel de agarosa y observamos que había presencia de bandas de ADN de alto peso molecular y que no había degradación.

En caso de que la concentración hubiese sido muy elevada, habríamos reducido la misma con agua de biología molecular para, después, volver a cuantificar.

La cuantificación es un paso esencial si se quiere llevar a cabo una amplificación mediante PCR. Como alternativa a la cuantificación de ADN por espectrofotometría cuando la cantidad disponible de ácidos nucleicos es escasa, se encuentran los geles de agarosa con el colorante bromuro de etidio u otro colorante diferencial (permite calcular la cantidad de ácidos nucleicos a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio irradiado con luz UV, comparándola con unos patrones de concentración). También se puede emplear la técnica de *Southern Blot*.

2.2.3. Valoración de la estabilidad de la cromatina espermática de semen fresco diluido de porcino sometido a incubaciones a 15 y a 37 °C, mediante el método SCSA.

Esta línea de trabajo, en la cual también participé, formaba parte de los experimentos que la doctoranda Rocío Fernández Gago estaba llevando a cabo. Trabajamos, conjuntamente, en uno de los laboratorios del Hospital Clínico Veterinario de León y en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León, ya que no disponíamos de equipos indispensables para la realización de la técnica SCSA en el primer laboratorio, tales como el citómetro de flujo y el congelador a una temperatura de -80 °C. También tuvimos la colaboración de Alejandra Besa Morán, estudiante del último curso de Veterinaria.

Recogimos muestras espermáticas de verracos en el Centro de Inseminación Artificial: AIM IBÉRICA (*Imagen*) para el análisis de ADN y estimamos el daño del material genético de los espermatozoides porcinos mediante la valoración de la estabilidad de la cromatina espermática por el método SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay).



Imagen 6: Centro de Inseminación Artificial. AIM IBÉRICA, Campo de Villavidel, León, España.

El principio en el que se sustenta la técnica SCSA hace referencia a que la cromatina que presenta ADN fragmentado tiene mayor susceptibilidad para ser desnaturalizada *in situ* tras aplicar un tratamiento con calor o una solución ácida. La segunda parte de la metodología se fundamenta en las características metacromáticas del naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de ADN como un monómero, que al ser excitado emite color verde, pero que presenta emisión en color rojo-anaranjado si se incorpora al ADN de cadena sencilla. Las células así teñidas se someten a citometría de flujo para discriminar entre ambos tipos de color (Hoshi *et al.*, 1996).

Muestreamos los espermatozoides a las 0, 24, 48, 72 y 144 horas de incubación, a 37 y a 15 °C, con objeto de establecer el punto en que comienza a producirse daño espermático (descenso significativo que compromete la fertilidad de las muestras), y cual es la temperatura de incubación que influye más negativamente en relación a parámetros de estabilidad cromatínica, así como de motilidad (evaluada por el método CASA -Computer Assisted Sperm Analysis-). También, queríamos determinar cómo de susceptibles son las distintas razas y machos integrados en el estudio, al daño de la cromatina espermática conforme aumenta el tiempo en que son mantenidas las muestras a incubación.

Para el experimento empleamos 5 razas porcinas: TNNNN o línea N (Landrace), TZZZZ o línea Z (Large White Hiperprolífico), TPPXL o “Extra lean”, TEEEEE o Tempo, TDDDD o Talent), de cada una de las cuales escogimos 3 machos y evaluamos tres eyaculados de cada uno de estos.

En este tipo de experimento tuvimos en cuenta que es necesario asegurar la homogeneidad de todo el proceso, ya que pueden generarse cambios en la cromatina si unas muestras son procesadas antes que otras, o si se mantienen a temperaturas o en medios distintos. En el momento del muestreo, identificamos los tubos en los que, después, almacenamos las muestras (especificando fecha y código del macho). Estos tubos contenían 500 µL de medio tamponado TNE (Tris-NaCl-EDTA), que habíamos añadido previamente. A continuación pasamos 33 µL de cada dosis (ya que asumimos que las dosis tenían una concentración de 30×10^6 espermatozoides /mL) a cada uno de los tubos anteriores, de manera que se obtenía una concentración final de 2×10^6 espermatozoides/mL. Una vez añadido el semen a los tubos con TNE, íbamos pasando

rápidamente estos tubos a cajas isotermas con nitrógeno líquido para después, almacenarlos a -80 °C hasta su análisis.

Las muestras las analizamos con un citómetro de flujo FACScalibur (*Imagen 7*) de la misma forma que se describe para la realización de la técnica SCSA en el *apartado 3.12* del Trabajo Fin de Máster.

Antes de evaluar las muestras de nuestro experimento, elaboramos muestras estándar para crear una plantilla (settings) de adquisición en el *software* del citómetro. La muestra estándar se prepara como las muestras a analizar (500 µL de TNE + 33 µL de semen) y está almacenada en un congelador a – 80 °C hasta su utilización. También se prepara un tampón de equilibrado con 0,4 mL de medio detergente-ácido y 1,2 mL de solución de tinción.

El objetivo que teníamos presente en este estudio era la valoración de la dinámica del daño en el ADN en muestras de semen porcino de diferentes razas, sometidos a dos patrones de temperaturas diferentes. La temperatura de 15 °C la seleccionamos por ser la temperatura estándar a la que se almacena el semen de porcino. con la temperatura de 37 °C pretendimos emular la temperatura que alcanza una muestra espermática en el tracto reproductor femenino tras la inseminación artificial.



Imagen 7: Citómetro de flujo FACScalibur
(Becton Dickinson System, San Jose, CA, EE.UU).

2.2.4. Valoración de los parámetros de motilidad de semen fresco diluido de porcino sometido a incubaciones a 15 y a 37 °C, por el método CASA.

Este trabajo también formaba parte de los experimentos que la doctoranda Rocío Fernández Gago estaba llevando a cabo. En este, únicamente, trabajamos en el laboratorio del Hospital Clínico Veterinario de León, ya que disponíamos del equipo necesario especificado en *Materiales y metodologías (Apartado 3.7)* del Trabajo Fin de Máster.

Las muestras que empleamos, así como los tiempos de muestro, son los mismos que en el apartado anterior.

Determinamos la motilidad espermática mediante la valoración de 5 μL de la muestra seminal descongelada (a tiempo 0 y a los diferentes tiempos de muestreo en los que las muestras son mantenidas a diferentes temperaturas de incubación (especificados con anterioridad).

Una vez depositamos los 5 μL de la muestra seminal en la cámara Makler, tomamos cuatro campos de cada muestra para su análisis, a posteriori, de las mismas. Después haremos una revisión visual de las imágenes, para eliminar las partículas no espermáticas, los espermatozoides erróneamente identificados como móviles/inmóviles y aquellas trayectorias incompletas o incorrectamente trazadas tras un cruce, para conseguir estimaciones fiables de los parámetros de movilidad.

Tenemos en cuenta la proporción de espermatozoides con motilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %), así como la cinemática. Los parámetros cinéticos que nos mide el sistema son: velocidad según la trayectoria curvilínea o real (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad según la trayectoria suavizada o media (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidad según la trayectoria rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), *wobble* o tambaleo (WOB, %), amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH, μm), frecuencia de cruce de batido (BCF, Hz). Nosotras tendremos en cuenta los parámetros que, según la bibliografía, tienen una mayor correlación con la fertilidad (MT, MP, VCL, VAP, VSL y ALH).

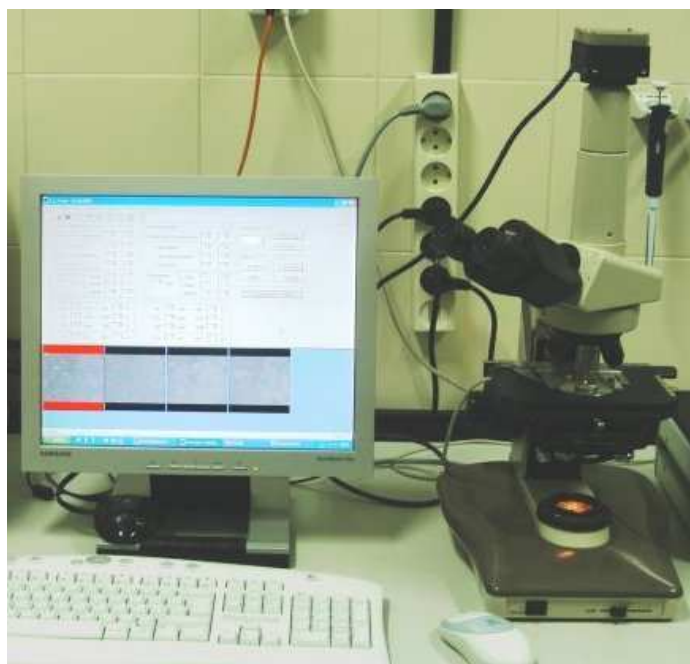


Imagen 8: Sistema CASA.

Tanto en este experimento, como en el descrito en el apartado 2.2.3, se emplea semen diluido: dilución 1:1 (v/v) en MR-A Thaw[®] (Kubus S.A., Majadahonda, España), a pesar de que su uso puede contribuir a retrasar la fragmentación del ADN de espermatozoides porcinos (Pérez-Llano *et al.*, 2006b). Sin embargo, el empleo de diluyentes puede ser beneficioso si se tiene en cuenta que altos niveles de estrés oxidativo pueden afectar los resultados de los experimentos llevados a cabo (Pérez-Llano *et al.*, 2010).

Durante el tiempo en que transcurre mi periodo de formación del *prácticum* llegamos a una serie de conclusiones para los apartados 2.2.3 y 2.2.4 que, aunque todavía precipitadas puesto que no se ha completado el experimento, coinciden con otras publicaciones anteriores que hacen referencia al citado diseño experimental, siendo diferentes los materiales empleados y los métodos a seguir (técnica de valoración empleada, puntos de muestreo, etc.).

Tras la valoración de la integridad de la cromatina espermática, así como de los parámetros de motilidad del semen, podemos concluir que la motilidad espermática se va a ver poco deprimida durante la primera fase de enfriamiento a 15 °C. Esto puede ser debido a una aparición más tardía de los signos deletéreos en la función motil.

La presencia en el semen descongelado de un porcentaje inferior de espermatozoides móviles que vivos, podría deberse a que estos espermatozoides se encuentran en una situación de bajo estado metabólico inmediatamente tras la descongelación.

Parece obvio, que con la estimación de la motilidad, solamente, no se puede considerar como un parámetro suficiente en la valoración del material seminal tras la criopreservación, siendo preferible el resultado de la integridad acrosomal.

En general, la incubación a 37 °C disminuye la calidad del ADN espermático. Cabe destacar que algunos autores (Pérez-Llano *et al.*, 2006a. Waterhouse *et al.*, 2006) demuestran que la calidad del ADN no guarda relación con la motilidad ni con la integridad acrosomal, a pesar de que en otras especies de mamíferos, dicha calidad ha sido relacionada directamente con la capacidad de fecundación del animal o del eyaculado.

La calidad del semen, determinada mediante motilidad espermática, disminuía más rápidamente a 37 °C que a 15 °C. A esta última temperatura se observaba una persistencia de motilidad tras 144 horas de incubación, hecho que no sucedía cuando el semen era sometido a 37 °C. En la mayoría de las muestras, aunque teniendo en cuenta las posibles diferencias existentes inter e intramacho, el porcentaje de espermatozoides móviles a las 48 horas se veía claramente reducido hasta, incluso, alcanzar valores del 0%.

El incremento de temperatura de incubación, elevaba los niveles basales de fragmentación del ADN.

Las citadas conclusiones llevadas a la práctica, indican que el empleo de temperaturas de 15 °C para la conservación de las dosis seminales, previo a la utilización de las mismas, es adecuado. Además, logra minimizar el porcentaje de fragmentación del ADN espermático.

Es importante citar que, en general, observamos un incremento en el índice de fragmentación del ADN (DFI) tras 72 horas de incubación. En un trabajo previo llevado a cabo por Boe-Hansen *et al.* (2005), se observó lo mismo. También se empleó la técnica SCSA pero se llevó a cabo una incubación a 18 °C. Es lógico que, además, se muestren diferencias entre razas, machos y, quizás, entre eyaculados, aunque esto último aún no se ha valorado

En otros trabajos se ha sugerido que las diferencias de susceptibilidad al daño del ADN espermático entre eyaculados, son el resultado de factores externos como el proceso de recolección, manejo y dilución de cada eyaculado (Waberski *et al.*, 2011).

3. Opinión personal.

Durante los meses de la estancia, he conocido el trabajo desempeñado en un laboratorio con enfoque al área de la reproducción, pues a lo largo de mis estudios universitarios, las prácticas no han tenido un enfoque tal que nos den a comprender la verdadera importancia de las técnicas llevadas a cabo, ni un conocimiento en profundidad de la utilidad y manejo de las mismas. También he afianzado conocimientos que nos han sido impartidos en el máster, en relación a la fragmentación del ADN de los espermatozoides, métodos para evaluarla y su importancia.

Además de conocer la actividad diaria de un laboratorio, he sabido valorar la importancia que toman: la organización, el trabajo en equipo y el aprendizaje del manejo de los diferentes aparatos y técnicas.

He participado activamente en los experimentos que ha realizado la doctoranda Rocío Fernández Gago durante mi estancia, aprendiendo a trabajar en un laboratorio con el correspondiente aprendizaje de las técnicas empleadas, la elaboración de medios, así como a elaborar un cuaderno de laboratorio.

Durante el máster hemos tenido varias asignaturas donde estudiábamos la fragmentación del ADN de los espermatozoides, métodos para evaluarla y su importancia. Con esta estancia he aprendido lo verdaderamente importante que es, porque he podido evaluarlo varias veces y he afianzado conocimientos dados en teoría, pero a los que se da bastante menos importancia de la que en realidad tienen.

También he aprendido nuevas técnicas de laboratorio, como los métodos CASA y SCSA, que nunca había empleado. Hemos analizado muestras y he tenido la oportunidad de estudiar los resultados.

Además, en mi trabajo fin de máster he tenido que profundizar mucho en diferentes técnicas, el fundamento, usos, así como las ventajas e inconvenientes de las mismas.

En conclusión, en el *prácticum* he aprendido nuevas técnicas y el manejo de un laboratorio de investigación. Además, he afianzado, con el trabajo personal, aspectos que me pueden ser de gran utilidad para un futuro profesional en un laboratorio.

Por último, tengo que agradecer la colaboración, preocupación, así como apoyo del Dr. y catedrático de Reproducción y Obstetricia Veterinaria de la Universidad de León, D. Juan Carlos Domínguez-Fernández Tejerina, de la doctoranda Rocío Fernández Gago, la bióloga Diana García-Miranda de la Puente, la alumna de último curso de veterinaria Alejandra Besa Morán y a mi tutor el Dr. Felipe Martínez Pastor. Y también, la ayuda y colaboración por parte de las empresas: ASCOL, Cogent y Semex España, S.A.

4. Referencias bibliográficas.

Hoshi, K., Katayose, H., Yanagida, K., Kimura, Y., and Sato, A. (1996). The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil. Steril.*, 66: 634–639.

Martínez-Alborcia, M.J., Morrell, J.M., Parrilla, I., Barranco, I., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Roca, J. (2012). Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing. *Theriogenology.*, 78: 1117-1125.

Morrell, J.M., Wallgren, M. (2011). Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science.*, 123: 64-6.

Pérez-Llano, B., García-Casado, P., Sala Echave, R., Gosálbez, A., López, C., Gosálvez, J. (2006a). DNA fragmentation and maturation in boar ejaculated sperm. In: Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, Oral Communication, p. 112.

Pérez-Llano, B., Enciso, M., García-Casado, P., Sala Echave, R., Gosálvez, J. (2006b). Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology.*, 66: 2137–2143.

Pérez-Llano, B., López-Fernández, C., García-Casado, P., Arroyo, F., Gosálbez, A., Salaa, R., Gosálvez, J. (2010). Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: Ejaculate and temperature effects. *Animal Reproduction Science.*, 119: 235–243.

Waberskia, D., Schapmanna, E., Henninga, H., Riesenbeck, A., Brandt, H. (2011). Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology.*, 75: 337–345.

Waterhouse, K.E., Haugan, T., Kommisrud, E., Tverdal, A., Flatberg, G., Farstad, W., Evenson, D.P., De Angelis, P.M. (2006). Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18: 781–788.

Morrell, J.M., Wallgren, M. (2011). Colloid Centrifugation of Boar Semen. *Reprod Dom Anim.*, 46 (Suppl. 2): 18–22.

Morrell, J.M., Johannisson, A., Dalin, A.-M., Rodriguez-Martinez, H. (2009). Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology.*, 72: 879-884.