



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Influencia del plasma seminal en la  
criopreservación espermática y en la separación de  
espermatozoides X e Y en la especie porcina**

**DIEGO VILELA ALKMIN**

**2014**



## TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1. **Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate.** Diego V. Alkmin, Cristina Perez-Patiño, Isabel Barranco, Inmaculada Parrilla, Juan M. Vazquez, Emilio A. Martinez, Heriberto Rodriguez-Martinez, Jordi Roca. *Cryobiology* 2014, doi:10.1016/j.cryobiol.2014.07.004
2. **Intra- and interboar variability in flow cytometric sperm sex sorting.** Diego V. Alkmin, Inmaculada Parrilla, Tatiana Tarantini, Laura Parlapan, David del Olmo, Juan M. Vazquez, Emilio A. Martinez, Jordi Roca. *Theriogenology* 2014;82:501–508
3. **Seminal plasma affects sperm sex-sorting in boars.** Diego V. Alkmin, Inmaculada Parrilla, Tatiana Tarantini, David del Olmo, Juan M. Vazquez, Emilio A. Martinez, Jordi Roca. *Reprod Fertil Dev* 2014, doi:10.1071/RD14088.





Jordi Roca Aleu e Inmaculada Parrilla Riera, Profesores del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia,

**AUTORIZAN:**

Al Licenciado en Veterinaria Diego Vilela Alkmin a presentar ante las autoridades correspondientes de la Universidad de Murcia la Tesis Doctoral titulada “Influencia del plasma seminal en la criopreservación espermática y en la separación de espermatozoides X e Y en la especie porcina (Influence of seminal plasma on cryopreservation and on sex-sorting of boar sperm)” para su tramitación. La Tesis, realizada bajo nuestra directa dirección y supervisión en el seno del grupo de investigación “Reproducción Animal” de la Universidad de Murcia, es un compendio de tres artículos de investigación publicados en revistas científicas internacionales incluidas en el primer tercio del Journal Citation Reports. Entendemos que la Tesis Doctoral reúne los requisitos legales necesarios para su exposición y defensa con el propósito de optar al título de Doctor en Veterinaria.

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos este informe en Murcia a 12 de Septiembre de 2014





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Fernando Tecles Vicente, Profesor Titular de Universidad del Área de Conocimiento de Medicina y Cirugía Animal y **Presidente Comisión Académica programa doctorado** \* "Tecnología de la Reproducción y Medicina Veterinarias", INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Influencia del plasma seminal en la criopreservación espermática y en la separación de espermatozoides X e Y en la especie porcina", realizada por D. Diego Vilela Alkmin, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Jordi Roca Aleu y D<sup>a</sup> Inmaculada Parrilla Riera, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 12 de septiembre de 2014, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 12 de septiembre de 2014





*Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria*  
*Campus Regional de Excelencia Internacional “Campus Mare Nostrum”*  
*Universidad de Murcia*



*Este trabajo ha sido financiado por  
el Ministerio de Ciencia y Tecnología  
(AGL2012-39903) y Fondos FEDER,  
la Fundación Séneca (04543/GERM/07) y  
Sexing Technologies (Navasota, Texas, USA).*



*A mis padres Geraldo y Marilda  
y mis hermanos Patricia y Gustavo.*



*A Tati y Pietro.*



## **Agradecimientos**

Estos cuatro años fueron un arduo camino de retos, de aprendizaje y maduración. No obstante, una conquista tan importante como ésta sería imposible sin la participación y ayuda de muchas personas. Por este motivo, agradezco sincera y profundamente a todas las personas que me alentaron a realizar este sueño. Quiero que todos los que me ayudaron en esta tarea se sientan incluidos en estos agradecimientos. Sin embargo, debo mencionar algunas personas que fueron sumamente importantes en todo el proceso de desarrollo y conclusión de esta Tesis. Por ello, querría expresar mi gratitud:

Al Dr. Jordi Roca, por toda su confianza y aliento desde el primer momento en este proyecto. Su sabiduría y paciencia fueron imprescindibles para conducirme en los momentos más difíciles, y al mismo tiempo, todas las exigencias me han hecho crecer personal y profesionalmente. Fue un inmenso honor y orgullo tenerle como director de Tesis.

A la Dra. Inmaculada Parrilla, por haber sido fundamental para la realización de este sueño. Echando la vista atrás, fueron muchos los obstáculos encontrados hasta que todos los planes se tornasen en realidad. Sabes que sin tu ayuda habría sido imposible estar hoy aquí. Gracias por tu amistad, tu apoyo y todos los momentos compartidos en estos años.

Al Dr. Emilio Martínez, para mí un ejemplo de líder, capaz de despertar la pasión por la investigación en todas las personas de este grupo y hacer que el trabajo sea más divertido. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de esta gran familia.

Al Dr. Juan María Vázquez, por todo el esfuerzo realizado desde el principio para que todo esto hoy fuera posible. Aunque la convivencia no fue muy constante, eres un ejemplo para nosotros por la capacidad de trabajo y por la ilusión para que nuestro trabajo como investigadores sea cada vez más valorado.

Un especial agradecimiento a las profesoras, Dra. María Antonia Gil, Dra. Cristina Cuello y Dra. Xiomara Lucas, por su amabilidad, por sus consejos, palabras de ánimo y por colaborar profundamente en mi formación.

A los extraordinarios amigos Jesus, Ana, David y Marta. Vuestra amistad fue muy importante para que fuéramos más felices aquí. Gracias por toda paciencia y ayuda, por los momentos inolvidables, por las cenas, las copas. Esperamos tener esta amistad durante muchos y muchos años. Además, a Jesus y David por haber sido gran compañeros de despacho, fueron muchos los momentos de alegrías, estrese, risas, preocupaciones, pero lo más importante serán los buenos recuerdos.

A Miguel Angel, por su compañerismo y toda ayuda desde el principio en el Máster. Por todos los momentos compartidos en nuestro despacho, especialmente la ayuda mutua en ese final de Tesis. Empezamos juntos, y la acabamos juntos.

A todos mis compañeros del departamento que tuve la suerte de compartir gratos momentos, Cristina M, Alicia y Lee, y muy especialmente a Carolina, Jonatán y Carmen Ródenas, por la ayuda, por el apoyo moral, ánimo y por vuestra amistad, que me han estimulado a seguir fortalecido en ese proyecto.

A María José y a “mis niñas” Isabel y Cristina Patiño, por toda ayuda en los experimentos y principalmente por los buenos ratos que permitieron que esta experiencia fuera mucho más agradable.

Lola, por todos los buenos momentos compartidos en el laboratorio de Andrologia, siempre dispuesta a echarme una mano. Eres para mí un gran ejemplo de dedicación que tendré en cuenta siempre.

A AIM Ibérica por la aportación de muestras biológicas y a los compañeros de AIM Calasparra por los buenos ratos y por siempre estar dispuestos a ayudarme. A Alfonso Bolarín por darme la oportunidad de formarme y aprender cada día más.

Al Consejo nacional de desarrollo científico y tecnológico (CNPq) - Programa Ciencia sin fronteras (BRASIL) por concederme la beca de Doctorado.

Al Dr. José Monteiro (Capela), mi primer gran profesor y maestro en este mundo de la investigación, por enseñarme a ser crítico y perfeccionista. Sus consejos y enseñanzas las llevaré conmigo siempre.

A mi amigo Serginho, por todo el apoyo, por empujarme a seguir y no dejar que perdiese la ilusión, y principalmente por su amistad.

A mi familia, que supo entender mi ausencia en los últimos años, por respetar mis decisiones, por apoyarme en todo momento, y sobre todo, por su amor incondicional. Sé lo orgullosos que estarán de mí.

A Tati, por estar siempre a mi lado, por su complicidad, por soportar mis momentos de ansiedad y el estrés, por apoyarme incondicionalmente y apostar por mí más que nadie. Todavía tenemos muchos sueños por cumplir. Siempre serás mi ángel. ¡Te quiero mucho!

A Pietro, por hacerme más feliz todos los días y ser capaz de recargarme las pilas con una simple sonrisa. Un día vas a leer esto y seguramente se sentirá orgulloso de tu papá. Gracias por llenar nuestras vidas de alegría.

A Dios, por la fe que me mantiene fuerte para buscar mis sueños, y por darme la oportunidad de conocer a todas las personas mencionadas.



**“¿Qué sería la vida si no tuviéramos el valor de intentar cosas nuevas?”**

***Vincent van Gogh (pintor holandés, 1853-1890)***

***“La tarea no consiste en ver lo que nadie ha visto, sino en pensar lo que nadie ha pensado acerca de aquello que todos ven”***

***Arthur Schopenhauer (filósofo alemán, 1788-1860)***



## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>21</b>
<b>Summary</b>	<b>27</b>
<b>Resumo</b>	<b>33</b>
<b>Introducción General</b>	<b>39</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>53</b>
<b>Objetivos</b>	<b>63</b>
<b>Artículo 1</b>	<b>67</b>
<b>Artículo 2</b>	<b>71</b>
<b>Artículo 3</b>	<b>75</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>79</b>
<b>Abreviaciones</b>	<b>83</b>
<b>Apéndices</b>	<b>86</b>
Apéndice A - Protocolo de criopreservación espermática	
Apéndice B- Protocolo de separación espermática	
Apéndice C- Procesado del plasma seminal	
Apéndice D- Procesado del epidídimo	
Apéndice E- Análisis de la calidad y funcionalidad espermática por citometría de flujo	
Apéndice F- Journal Citation Reports 2013	



# RESUMEN



Esta Tesis Doctoral propone una serie de experimentos orientados a mejorar el conocimiento sobre la influencia del plasma seminal (PS) de porcino en la (1) criopreservación espermática, evaluando la influencia de la incubación antes de la congelación de las muestras espermáticas en su propio PS, proveniente bien del eyaculado completo o bien de alguna de sus fracciones/porciones, sobre la calidad y la funcionalidad espermática tras la descongelación (**Artículo 1**); y (2) capacidad de separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo, evaluando la relevancia del PS en la variabilidad observada en la eficiencia del proceso de separación y su posterior repercusión en la calidad y funcionalidad de los espermatozoides separados conservados a 15-17 °C (**Artículos 2 y 3**). La calidad espermática fue valorada en términos de motilidad (valoración objetiva mediante sistema CASA) y viabilidad (integridad de membranas plasmática y acrosomal valorada por citometría de flujo). La funcionalidad espermática fue valorada por citometría de flujo en términos de producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), permeabilidad de la membrana plasmática y potencial de membrana de la vaina mitocondrial.

En el **Artículo 1**, los espermatozoides procedentes del eyaculado completo (EC) o de sus fracciones (primeros 10 mL de la fracción rica en espermatozoides (FRE) [P1] y del resto de la FRE [P2]) de 10 verracos fueron mantenidos por 24 h a 15-17 °C en su propio PS y posteriormente congelados. Espermatozoides procedentes de eyaculados completos también fueron congelados inmediatamente después de la recogida como grupo Control (C). Para una mejor comprensión de los efectos del PS en la criopreservación espermática en porcino, muestras espermáticas procedentes del epidídimo de los mismos 10 verracos fueron recogidas post mortem y diluidas en el PS de la P1 (EP1), P2 (EP2) y post FRE (EP3) y mantenidas 24 h a 15-17 °C antes de la congelación. Los resultados mostraron que los espermatozoides del EC criopreservaban peor ( $P < 0,05$ ) que los de la P1 y P2 y también que los del C. Además, la calidad y la funcionalidad espermática tras la descongelación en los grupos EP1 y EP2 fueron similares ( $p > 0,05$ ), aunque superiores ( $p < 0,05$ ) a del grupo EP3. Estos resultados demuestran que el PS de la fracción post FRE perjudica la congelabilidad espermática en porcino.

El **Artículo 2** propone evaluar la importancia del verraco y del eyaculado dentro de un mismo verraco en la variabilidad existente y reconocida en el procedimiento de separación espermática por citometría

de flujo. Un total de 132 eyaculados procedentes de 67 verracos fueron sometidos al procedimiento de separación espermática. En un primer experimento un total de 67 eyaculados (un eyaculado por verraco) fueron sometidos al procedimiento de separación espermática, siendo muy difícil identificar las poblaciones de espermatozoides X e Y en el histograma en cerca del 15% de los eyaculados. En un segundo experimento 5 eyaculados de verracos cuyo eyaculado mostró una buena (n=5) o deficiente (n=3) identificación de las poblaciones X e Y en el histograma en el experimento 1 fueron procesados con el propósito de evaluar variabilidad entre eyaculados de un mismo verraco en la separación espermática. Dicha variabilidad solamente se observó en los 3 verracos que mostraron una deficiente identificación de las poblaciones X e Y en un primer eyaculado. La concentración espermática del eyaculado mostró tener un buen valor predictivo positivo para tal identificación (un área bajo curva ROC del 0,88;  $p < 0,001$ ). Ya que los eyaculados con una baja concentración espermática presentan una mayor proporción de PS, estos resultados abren la hipótesis que una alta proporción de PS en el eyaculado podría dificultar la identificación de las poblaciones de espermatozoides X e Y en el histograma y, por lo tanto, menoscabar la eficiencia del proceso de separación espermática.

En el **Artículo 3**, se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar la influencia de la incubación (24 h) de los espermatozoides en su propio PS antes de la separación sobre la eficiencia del proceso de separación espermática y en la posterior conservación en refrigeración (15-17 °C) de los espermatozoides separados. Para ello, muestras de semen de 30 eyaculados conteniendo 50%, 10% o 0% de PS fueron sometidos al proceso de separación inmediatamente tras la recogida del eyaculado o después de 24 h de incubación a 15-17 °C. En el primer experimento (20 eyaculados de otros tantos verracos) se evaluó la facilidad o dificultad para identificar las poblaciones de espermatozoides X e Y en el histograma y la posterior eficiencia del procedimiento de separación. La identificación de las poblaciones X e Y fue más fácil en las muestras con 0 y 10% de PS. Asimismo, la eficiencia del proceso de separación fue mayor ( $P < 0,05$ ) en las muestras de semen con 0 y 10% de PS que en la de 50%. En un segundo experimento (muestras seminales de 10 eyaculados de 5 verracos con buena capacidad para identificar las poblaciones X e Y en el histograma, 2 eyaculados por verraco) se evaluó la calidad y funcionalidad de los espermatozoides separados y conservados en refrigeración

(valoraciones a las 0, 72 y 120 h de almacenamiento a 15-17 °C). El periodo de incubación en su propio PS (24 h) y la proporción de PS (0, 10 y 50%) no afectó la calidad o la funcionalidad de los espermatozoides separados a lo largo del tiempo de almacenamiento. Estos resultados ponen de relieve que una alta proporción de PS (50%) en las muestras de semen reduce la eficiencia del proceso de separación pero no perjudica la posterior capacidad de los espermatozoides separados para soportar un largo almacenamiento a 15-17 °C. También evidencian que un tiempo de incubación de las muestras de semen de hasta 24 h antes de la separación no influye sobre el éxito de la técnica.

En su conjunto estos estudios demuestran que la incubación de los espermatozoides de porcino en su propio PS influye sobre la capacidad de dichos espermatozoides para soportar la criopreservación y también la separación espermática en poblaciones X e Y mediante citometría flujo. El PS de la fracción post FRE tendría un efecto negativo sobre la congelabilidad espermática, mientras que la incubación de los espermatozoides en presencia de una alta proporción de PS perjudicaría la eficiencia del proceso de separación.

Palabras clave: semen, criopreservación, epidídimo, espermatozoide, semen sexado, plasma seminal, período de incubación, semen refrigerado, verraco, porcino.



# SUMMARY



The present Doctoral Thesis proposes a series of experiments aimed to improve the knowledge of the putative effects of porcine seminal plasma (SP) on (1) sperm cryopreservation; by evaluating the influence of holding time of ejaculate sperm before freezing surrounded in their own SP, from either entire ejaculate or some ejaculate specific fractions/portions, on post-thawing sperm quality and functionality (**Article 1**) and on (2) sperm sex-sorting procedure; by evaluating the relevance of ejaculate SP on inter- and intra-boar variability in sperm sortability and on capability of sex-sorted sperm to tolerate liquid storage at 15-17 °C, assessed according to sperm quality and functionality (**Articles 2 and 3**). Sperm quality was assessed in terms of motility (evaluated objectively using CASA system) and viability (simultaneous evaluation of plasma membrane and acrosome integrity using flow cytometry). Sperm functionality was assessed by flow cytometry in terms of plasma membrane fluidity, intracellular hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generation and mitochondrial membrane potential.

In the **Article 1**, ejaculates collected as bulk (BE) or as separate (first 10 mL of sperm-rich fractions (SRF) [P1] and rest of SRF [P2]) from 10 boars were held 24 h at 15-17°C and then frozen. Some bulk ejaculate samples were frozen immediately after collections as Control (C). For a better understanding of the effects of SP on boar sperm cryopreservation, epididymal sperm samples from the same 10 boars were collected post-mortem and extended in SP from P1 (EP1), P2 (EP2) and post SRF (EP3), and held 24 h at 15-17 °C before freezing. The results showed that sperm from BE are more cryosensitive ( $P < 0.05$ ) than those from the P1 and P2, and also that of C. Besides, post-thawing sperm quality and functionality of EP1 and EP2 were similar ( $p > 0.05$ ) but higher ( $p < 0.05$ ) than EP3. These results demonstrate that the SP from post SRF fraction is detrimental to boar sperm freezability.

The **Article 2** proposes to evaluate the relevance of inter- and intra-boar variability in the flow-based sperm sex-sorting procedure. A total of 132 ejaculates from 67 boars were subjected to sperm sorting. In a first experiment, 67 ejaculates (one ejaculate per boar) were subjected to sperm sorting procedure, showing 15% of them difficulties in the identification of the X and Y sperm populations in the histogram. In a second experiment, five ejaculates from boars whose ejaculate showed good ( $n = 5$ ) or poor ( $n = 3$ ) identification of the X and Y sperm population in the histogram in experiment 1 were

processed for the purpose of evaluating intra-boar variability in the ability of sperm to withstand the sorting process. Intra-boar variability was observed only in the 3 boars which showed difficulties for the identification of X and Y sperm populations in the first ejaculate (Exp. 1). The sperm concentration of ejaculates showed a good positive predictive value with the ability of sperm to display properly X and Y sperm population in the histogram (area under the ROC curve 0.88;  $p < 0.001$ ). Since ejaculates with a relatively low sperm concentration have a higher proportion of SP, it is plausible that a highest proportion of SP jeopardizes the correct identification of X and Y sperm populations in the histogram and, consequently, impairs the sorting efficiency.

In the **Article 3**, two experiments were carried out to assess the influence of holding (24 h) boar sperm surrounded in their own SP before sorting on the efficiency of the sorting process and on the subsequent liquid storage (15 -17 °C) of sorted sperm. Semen samples from 30 ejaculates containing 50%, 10% or 0% of SP were sex-sorted either immediately after collection or after 24 h of storage at 15-17 °C. In the first experiment, the ability to display well-defined X- and Y- sperm populations in the histogram and the subsequent sorting efficiency were assessed in 20 ejaculates (one per boar). The identification of X and Y sperm populations was easier and the sorting efficiency higher ( $P < 0.05$ ) in semen samples with 0 and 10% SP compared with those with 50% SP, irrespective of the holding time before sorting. In a second experiment, using semen samples from 10 ejaculates of 5 boars (2 ejaculates per boar) with known good ability to display well-defined X and Y sperm populations in the histogram, the quality and functionality of sex-sorted sperm were evaluated at 0, 72 and 120 h of storage at 15-17°C. The holding time (24 h) and the SP proportion (0, 10 and 50%) did not influence the quality or functionality of stored sex-sorted sperm. These results show that a high proportion of SP (50%) in semen samples reduces the sorting efficiency, but does not impair the subsequent ability of sorted sperm to support a long-term storage at 15-17 °C. It also evidences that a holding time as long as 24 h before sorting could be used without impairment to the sex-sorting procedure.

Taken together these experiments show that holding boar sperm in their own SP negatively influences their ability to withstand cryopreservation, particularly the SP from post-SRF, and flow-based sex-sorting procedure.

Keywords: semen, cryopreservation, epididymis, sperm, sex-sorting, seminal plasma, holding time, liquid storage, boar, porcine.



# RESUMO



Esta Tese de Doutorado propõe uma série de experimentos orientados a melhorar o conhecimento sobre a influência do plasma seminal (PS) em suínos na (1) criopreservação espermática, avaliando a influência da incubação antes da congelação das amostras espermáticas em seu próprio PS, oriundas tanto de frações/porções como do ejaculado completo, na qualidade e funcionalidade espermática pós-descongelação (**Artigo 1**) e na (2) capacidade de separação de espermatozoides X e Y por citometria de fluxo, avaliando a relevância do PS sobre a variabilidade observada na eficiência do processo de separação e sua posterior repercussão na qualidade e funcionalidade dos espermatozoides separados conservados a 15-17 °C (**Artigos 2 e 3**).

A qualidade espermática foi avaliada em termos de motilidade (avaliação objetiva mediante sistema CASA) e viabilidade (integridade das membranas plasmática e acrossomal avaliada por citometria de fluxo). A funcionalidade espermática foi avaliada por citometria de fluxo em termos de produção intracelular de substâncias oxigênio reativas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), permeabilidade da membrana plasmática e potencial de membrana da bainha mitocondrial.

No **Artigo 1**, os espermatozoides procedentes do ejaculado completo (EC) ou de suas frações (primeiros 10 mL da fração rica em espermatozoides (FRE) [P1] e resto da FRE [P2]) de 10 varrões foram mantidos por 24 h a 15-17°C em seu próprio PS e posteriormente congelados. Espermatozoides procedentes do ejaculado completo também foram congelados imediatamente após a coleta e considerados como grupo Controle (C). Para uma melhor compreensão dos efeitos do PS sobre a criopreservação espermática em suínos, amostras de sêmen provenientes do epidídimo dos mesmos 10 varrões foram coletadas pós-mortem e diluídas em PS da P1 (EP1), P2 (EP2) e da pós FRE (EP3), e mantidas 24 h antes da congelação. Os resultados mostraram que os espermatozoides do EC criopreservaram pior ( $P < 0,05$ ) que os da P1 e P2 e também que os do C. Além disso, a qualidade e funcionalidade espermática pós-descongelação nos grupos EP1 e EP2 foram similares ( $p > 0,05$ ), embora superiores ( $p < 0,05$ ) ao do grupo EP3. Estes resultados demonstram que o PS da fração post FRE prejudica a congelabilidade espermática em suínos.

O **Artigo 2** propõe avaliar a importância do varrão e do ejaculado dentro do mesmo varrão na variabilidade existente e conhecida no procedimento de separação espermática por citometria de fluxo.

Um total de 132 ejaculados de 67 varrões foi submetido ao procedimento de separação espermática. No primeiro experimento, um total de 67 ejaculados (um ejaculado por varrão) foi submetido ao procedimento de separação espermática, sendo muito difícil identificar as populações de espermatozoides X e Y no histograma em cerca de 15% dos ejaculados. Em um segundo experimento, cinco ejaculados de varrões cujo ejaculado mostrou uma alta ( $n = 5$ ) ou baixa ( $n = 3$ ) capacidade de identificação das populações X e Y no histograma no experimento 1, foram processadas com o propósito de avaliar a variabilidade entre ejaculados de um mesmo varrão na separação espermática. Esta variabilidade somente foi observada nos três varrões que mostraram uma deficiente identificação das populações X e Y no primeiro ejaculado. A concentração espermática do ejaculado mostrou ter um bom valor preditivo positivo para essa identificação (área sob a curva ROC de 0,88;  $p < 0,001$ ). Considerando que os ejaculados com uma baixa concentração espermática apresentam uma maior proporção de PS, estes resultados abrem a hipótese de que uma alta proporção de PS no ejaculado poderia dificultar a identificação das populações de espermatozoides X e Y no histograma e, portanto, limitar a eficiência do processo de separação espermática.

No **Artigo 3** foram realizados dois experimentos para avaliar o efeito da incubação (24 h) dos espermatozoides em seu próprio PS antes da separação sobre a eficiência do processo de separação espermática e na posterior conservação em refrigeração a 15-17 °C dos espermatozoides separados. Para isso, amostras de sêmen de 30 ejaculados contendo 50%, 10% ou 0% de PS foram submetidos ao processo de separação imediatamente após a coleta do ejaculado ou após 24 h de incubação a 15-17°C. No primeiro experimento, 20 ejaculados (um por varrão) foram avaliados quanto à facilidade ou dificuldade para identificar as populações de espermatozoides X e Y no histograma e sua subsequente eficiência no procedimento de separação. A identificação das populações X e Y foi mais fácil nas amostras com 0 e 10% de PS. Além disso, a eficiência do processo de separação foi maior ( $P < 0,05$ ) nas amostras de sêmen com 0 e 10% de PS em comparação com aquelas com 50%. Em um segundo experimento, amostras de sêmen de 10 ejaculados de 5 varrões que mostraram boa capacidade em identificar as populações X e Y no histograma (2 ejaculados por varrão) foram avaliadas quanto à qualidade e funcionalidade dos espermatozoides separados e conservados em refrigeração (avaliações

às 0, 72 e 120 h de armazenamento a 15-17 °C). O período de incubação em seu próprio PS (24 h) e a proporção PS (0, 10 e 50%) não influenciaram a qualidade ou funcionalidade do sêmen separado durante o tempo de conservação. Estes resultados demonstram que uma alta proporção de PS (50%) nas amostras de sêmen reduz a eficiência do processo de separação, mas não afeta a subsequente capacidade dos espermatozoides separados em suportar um longo armazenamento a 15-17 °C. Também evidenciam que um tempo de incubação das amostras de sêmen por até 24 horas antes da separação, não afeta o sucesso da técnica.

Como conclusão, estes estudos demonstram que a incubação dos espermatozoides de suínos em seu próprio PS influencia em sua capacidade para suportar a criopreservação e também a separação espermática em populações X e Y mediante citometria de fluxo. O PS da fração pós FRE teria um efeito negativo sobre a congelabilidade espermática, enquanto que a incubação dos espermatozoides na presença de uma proporção elevada de PS prejudicaria a eficácia do processo de separação.

Palavras-chave: sêmen, criopreservação, epidídimo, espermatozoide, sêmen sexado, plasma seminal, período de incubação, sêmen refrigerado, varrão, suíno.



# INTRODUCCIÓN GENERAL



# INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.- Relevancia de las biotecnologías espermáticas en la industria porcina

La carne de cerdo tiene una gran importancia para la dieta humana representando alrededor del 40% de toda la carne consumida mundialmente. Además, se prevé que su consumo siga aumentando, hasta alcanzar 15'3 kg/per cápita el próximo año, manteniéndose esta cantidad hasta el año 2030 y superando el consumo de carne de vacuno (OCDE-FAO 2013). Esta tendencia evidencia la continua necesidad de la mejora en la eficiencia de producción en la industria porcina. Avances significativos se han producido ya como consecuencia directa de la utilización de tecnologías reproductivas, las cuales permiten, entre otras cosas, optimizar la mejora genética para la producción de alimentos de origen animal (Gerrits y cols., 2005). Así, por ejemplo, el amplio uso de la inseminación artificial (IA) ha tenido un gran impacto tanto para acelerar la mejora genética como para aumentar la eficiencia productiva en los últimos 35 años (Gerrits y cols., 2005).

Los avances tecnológicos en reproducción porcina se han producido, en parte, debido a la cada vez más extendida toma de conciencia por parte de los agentes interesados de las ventajas que conlleva la utilización de verracos con características productivas superiores en los programas de IA. Biotecnologías reproductivas aplicadas a los espermatozoides como la criopreservación y la separación en poblaciones X e Y mediante citometría de flujo como método para predeterminar el sexo de la progenie, son complementarias, de manera independiente o asociadas, a la propia IA y constituyen valiosas herramientas para acelerar la mejora genética y para incrementar la eficiencia productiva.

Sin embargo, estas dos biotecnologías apenas son utilizadas por la industria porcina, algo más la primera estando en fase experimental todavía la segunda. El impacto perjudicial que ambas tienen sobre la calidad espermática, el cual ha sido relacionado, en cierta medida, con las diluciones que se producen durante el procesado del semen y que conllevan, en la mayoría de los casos, la consiguiente disminución de la proporción de plasma seminal (PS) o incluso su completa eliminación, es una de las

principales causas limitantes para su uso a nivel comercial (revisado por De Graaf y cols., 2008). Desafortunadamente, los estudios realizados hasta el momento sobre el efecto del PS en los espermatozoides de verraco sometidos a estas biotecnologías no han proporcionado todavía resultados concluyentes, más aún, algunos de los resultados alcanzados son contradictorios en naturaleza (revisado por Caballero y cols., 2012). Las diferencias observadas entre estudios podrían explicarse por la complejidad y la variabilidad en la composición del PS o incluso en base a la fuente de PS utilizado. Aunque, hasta la fecha, se han logrado considerables avances, es indudable que nuevos estudios sobre los potenciales efectos del PS contribuirían a una mejor comprensión de la funcionalidad de los espermatozoides sometidos a diferentes biotecnologías, lo que podría facilitar el desarrollo de protocolos eficientes tanto para la criopreservación como para la separación espermática, contribuyendo a mejorar los rendimientos y resultados de estas biotecnologías y por tanto su acercamiento al nivel productivo. El objetivo prioritario de esta Tesis Doctoral es precisamente mejorar el conocimiento de los efectos que el PS presente en las muestras de semen puede tener sobre los espermatozoides sometidos a la criopreservación o a la separación espermática mediante citometría de flujo.

## **2.- Características del plasma seminal en la especie porcina**

El PS es un fluido complejo, caracterizado por tener un gran contenido de agua, iones, azúcares, ácidos orgánicos, hormonas, y gran variedad de aminoácidos y proteínas. El PS proporciona las fuentes de energía para los espermatozoides, tanto para el metabolismo aeróbico como anaeróbico (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Este fluido es una mezcla de secreciones procedentes del epidídimo y principalmente de las glándulas sexuales accesorias, y acompaña a los espermatozoides durante la eyaculación. La composición del PS, además de ser cualitativamente compleja, varía entre especies y entre individuos dentro de una misma especie (Maxwell y cols., 2007). En porcino tiene una gran importancia, ya que los eyaculados de porcino son, proporcionalmente y en comparación con los de otras especies, los que más PS contienen. Tradicionalmente, las funciones del PS se asociaban

exclusivamente a proteger y nutrir a los espermatozoides durante la eyaculación (Mann y Lutwak-Mann, 1981), obviando cualquier posibilidad de que influyera en su actividad funcional. No obstante, desde hace ya algunos años, las funciones del PS respecto a los espermatozoides están siendo reconsideradas y actualmente conocemos que el PS influye directamente en la respuesta funcional de los espermatozoides, incluyendo su capacidad fecundante (Rodríguez-Martínez y cols., 2009). Más recientemente diferentes investigaciones demuestran que bien directa o indirectamente el PS también modularía la respuesta de los espermatozoides a las arriba mencionadas biotecnologías, aunque los resultados alcanzados hasta ahora ofrecen ciertas contradicciones (De Graaf y cols., 2008; Caballero y cols., 2012; Burroughs y cols., 2013).

Entre los componentes del PS de porcino destacan, por su cantidad e importancia, las proteínas. Dichas proteínas se pueden clasificar en tres grandes familias, (1) proteínas ricas en cisteína (CRISP), (2) aquellas que contienen el dominio fibronectina tipo II (Fn-2), y (3) las de bajo peso molecular, agrupadas bajo la denominación de espermadhesinas (Rodríguez-Martínez y cols., 2011). Se ha demostrado que las proteínas del PS tienen un papel determinante en regular la capacitación espermática, la subsecuente reacción acrosómica y posterior capacidad fecundante (Caballero y cols., 2008). Además están implicadas en el transporte espermático en el tracto genital femenino (Rodríguez-Martínez y cols., 2011), en la formación del reservorio espermático en el oviducto (Caballero y cols., 2012), en la comunicación espermatozoides-ovocito (Leahy y Gadella, 2011) y en modular la actividad inmuno-reguladora del tracto genital de la cerda (Rodríguez-Martínez y cols., 2010).

También destacan aquellos componentes con capacidad antioxidante, siendo los de naturaleza proteica con propiedades enzimáticas los más relevantes (Koziorowska-Gilun y cols., 2011). Iones como el Zinc (Zn) y el Selenio (Se) estarían también implicados en la funcionalidad espermática (Mogielnicka-Brzozowska y cols, 2011).

### **3.- Criopreservación espermática en la especie porcina**

La criopreservación espermática es el método más eficaz para la conservación a largo plazo del material genético masculino. Esta capacidad de conservación a largo plazo le atribuye a los espermatozoides criopreservados importantes ventajas en cuanto a bioseguridad y difusión con respecto al más habitualmente empleado semen fresco o refrigerado (Bailey y cols., 2008), por lo que la técnica se ofrece como la más idónea para diseminar de forma segura la calidad genética de verracos superiores (Thurston y cols. 2002). Sin embargo, a pesar de estas importantes ventajas con respecto al semen fresco o refrigerado, actualmente apenas el 1% de las cerdas inseminadas lo son con espermatozoides criopreservado (Roca y cols., 2011), limitándose su empleo casi exclusivamente a los núcleos de selección (Tribout y cols., 2010). Tradicionalmente, la utilización limitada del semen criopreservado quedaba justificada por el elevado número de espermatozoides necesarios por dosis de inseminación y por los resultados de fertilidad y prolificidad alcanzados, sensiblemente menores que con el semen fresco o refrigerado (revisado por Roca y cols., 2006). Sin embargo, los importantes avances que se han implementado recientemente en los protocolos de criopreservación junto con el desarrollo de procedimientos de IA que permiten reducir de forma significativa el número de espermatozoides por dosis de inseminación, han hecho posible un aumento eficiente de la fertilidad obtenida, obteniéndose valores similares a los del semen refrigerado (Didion y cols., 2013; Knox, 2011; Roca y cols., 2011) y contribuyendo de forma relevante a superar uno de los inconvenientes principales asociados a la aplicación práctica de espermatozoides criopreservados en la especie porcina. No obstante, todavía existe una importante variabilidad entre ensayos de inseminación en la fertilidad y prolificidad de los espermatozoides criopreservados (Eriksson y cols., 2002; Bolarín y cols., 2006; Didion y cols., 2013) y por lo tanto más investigaciones son todavía necesarias para que los espermatozoides criopreservados puedan emplearse de manera eficiente en los programas comerciales de IA porcina.

### 3.1.- Influencia del plasma seminal en la criopreservación espermática en porcino

A pesar de los avances alcanzados hasta el momento, otra limitación importante que impide la aplicación comercial de los espermatozoides criopreservados en porcino es la gran variabilidad observada entre eyaculados respecto a la calidad y funcionalidad espermática tras la criopreservación (Okazaki y Shimada, 2012), debiéndose descartar muchos eyaculados por una baja criosupervivencia espermática. Al respecto, se ha demostrado que los espermatozoides procedentes del epidídimo criopreservan mejor y apenas muestran variabilidad entre muestras epididimales y/o entre verracos en la criosupervivencia. Asimismo se ha comprobado que los espermatozoides procedentes de los primeros 10 mL de la fracción rica del eyaculado muestran resultados similares a los del epidídimo en cuanto a la buena tolerancia a la criopreservación con escasa variabilidad entre muestras en la criosupervivencia (Saravia y cols., 2009; Siqueira y cols., 2011). Esta propiedad, mejor y menos variable criosupervivencia, mostrada por los espermatozoides presentes en los 10 primeros mL de la fracción rica se atribuye a la peculiar composición del PS presente en esta porción del eyaculado (Rodríguez-Martínez y cols., 2009). El eyaculado en porcino es expelido en tres fracciones de relativa fácil identificación, cada una de ellas con diferente proporción entre espermatozoides y PS, pero que además muestran también diferencias en la composición del PS, principalmente diferencias cuantitativas y particularmente relacionadas con su contenido de proteínas (Rodríguez- Martínez y cols., 2011). Curiosamente, los resultados subóptimos en la criopreservación espermática suelen ser más evidentes en las especies con eyaculación fraccionada, como en cánidos, porcinos y équidos, donde los espermatozoides son expuestos a PS con diferencias en su composición según la fracción del eyaculado (Rodríguez-Martínez y Peña, 2013). Entonces parece que el PS influye en la congelabilidad espermática en porcino y que los espermatozoides criopreserven mejor o peor dependiendo de la fracción o porción del eyaculado de la cual procedan podría estar relacionado con la composición del PS. También es factible que diferencias entre verracos y entre eyaculados dentro de un mismo verraco en la congelabilidad espermática puedan tener su origen en una falta de uniformidad

de las muestras seminales a criopreservar en cuanto a su origen y en base a la composición del PS. Esta Tesis Doctoral pretende elucidar estas dudas y abordar las hipótesis que de ellas se plantean. La repercusión que el PS pueda tener sobre la congelabilidad espermática o sobre cualquier otra biotecnología espermática ha adquirido, si cabe, mayor relevancia en la actualidad debido a los cambios que los centros de inseminación están llevando a cabo en los protocolos de recogida de los eyaculados. Tradicionalmente el método de recogida ha sido la técnica manual, método de la mano enguantada, que permite con cierta objetividad discriminar entre las diferentes fracciones del eyaculado durante la eyaculación y, consecuentemente, seleccionar cual de ellas se recoge o no. Sin embargo, en los últimos años, y siempre bajo criterios de mejorar la eficiencia en la producción de dosis seminales y la calidad sanitaria de las mismas (Waberski y cols., 2010), la recogida manual está siendo remplazada por procedimientos de recogida semiautomáticos, como el Collectis<sup>®</sup>, los cuales permiten, con menos mano de obra, recoger un mayor número de espermatozoides y reducir la contaminación bacteriana presente en el eyaculado (Barrabes Aneas y cols., 2008). Por el contrario estos nuevos procedimientos no permiten la recogida fraccionada del eyaculado, siendo necesario recoger el eyaculado completo, lo cual aumenta la proporción de PS en las muestras seminales, y consecuentemente, su influencia en la congelabilidad espermática.

### 3.2.- Efecto del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides de verraco en su propio plasma seminal antes de la congelación

Actualmente se acepta de forma generalizada que mantener los espermatozoides de porcino incubados en su propio PS durante varias horas antes de la refrigeración previa a la congelación mejora la resistencia de los espermatozoides al choque por el frío y, por lo tanto, también mejora su congelabilidad (Pursel y cols., 1973; Juárez y cols., 2011). Sin embargo, no existe consenso en cuanto a la duración de dicho periodo de incubación, observándose diferencias sustanciales en el mismo entre los diferentes protocolos de criopreservación utilizados (Eriksson y cols., 2002; Hernández y cols., 2007; Vadnais y cols., 2011; Tomás y cols., 2014). Asimismo, tampoco existe acuerdo con respecto a

la evidencia de su efectividad en la congelabilidad espermática. Así, por ejemplo, mientras que algunos investigadores afirman que la exposición prolongada de los espermatozoides en su propio PS mejora sustancialmente la congelabilidad (Yeste y cols., 2014), otros encuentran que su influencia es inconsecuente o incluso perjudicial (Guthrie y Welch, 2005; Okazaki y cols., 2009). Una explicación posible para estas discrepancias podría estar en la falta de uniformidad entre los estudios respecto al origen (todo eyaculado o de una fracción) y las características del PS utilizado. También es propósito de esta Tesis Doctoral elucidar las razones de tales discrepancias.

Valorar la trascendencia de un tiempo de mantenimiento de los espermatozoides incubándose en su propio PS antes de someterlos a la congelación es crucial en la especie porcina ya que habitualmente entre la recogida y la congelación media un tiempo prudencial, el necesario para transportar los eyaculados desde centro de recogida al laboratorio de criobiología, tiempo que puede oscilar entre unas pocas horas y días enteros (Tomás y cols., 2014; Yeste y cols., 2014). El procedimiento seguido habitualmente consiste en mantener los eyaculados poco diluidos y transportarlos al laboratorio de criobiología a una temperatura de 15-17 °C. Cuanto mayor sea el tiempo de mantenimiento entre la recogida y la congelación que garantice una buena congelabilidad espermática, más centros de inseminación podrán aportar eyaculados para la criopreservación, incluso aquellos muy alejados de los laboratorios de criobiología. Durante este tiempo de mantenimiento los espermatozoides están expuestos y en contacto directo con el PS, lo cual puede influir en la posterior congelabilidad espermática, como hemos comentado anteriormente. Como alternativa, el PS podría eliminarse inmediatamente después de la recogida del eyaculado y así evitar cualquier efecto nocivo que el PS pudiera tener sobre la congelabilidad espermática. Valorar estas opciones también es propósito de la presente Tesis Doctoral.

#### **4.- Separación espermática en poblaciones X e Y por citometría de flujo en la especie porcina**

La separación de espermatozoides en poblaciones X o Y destaca entre las principales biotecnologías espermáticas al permitir poder preseleccionar el sexo de la descendencia (Vázquez y cols., 2003). La

utilización de espermatozoides separados en programas de IA, abriría una nueva dimensión en la industria porcina (revisado por Roca y cols., 2011). La principal demanda de dosis con espermatozoides separados para programas de IA estaría probablemente relacionada con el empleo más eficiente de verracos de genética superior en los núcleos de selección y en las granjas de multiplicación (revisado por Johnson y cols., 2005). Asimismo, el empleo de espermatozoides separados en combinación con la genética molecular permite acelerar la tasa de progreso genético para la selección de los reproductores (Niemann y cols., 2011).

En la actualidad, la citometría de flujo es el único procedimiento eficaz y fiable para poder separar los espermatozoides según su cromosoma sexual (Garner y cols., 2013). La técnica se basa en la diferente cantidad de ADN que contienen los espermatozoides según sean portadores del cromosoma X o Y (Johnson y cols., 1989). La técnica incluye varias etapas y entre las más importantes está la incubación de los espermatozoides con el fluorocromo Hoechst 33342 (H-42). Dicho fluorocromo debe unirse al ADN del espermatozoide y en función de la cantidad de ADN que contengan los espermatozoides éstos emitirán más o menos fluorescencia permitiendo distinguir dos poblaciones espermáticas bien definidas, la portadora del cromosoma X, con mayor cantidad de ADN y por lo tanto mayor emisión de fluorescencia, y la portadora del cromosoma Y, menor cantidad de ADN y menor emisión de fluorescencia (Johnson y Schulman, 1994).

#### 4.1.- Factores limitantes para la aplicación comercial de espermatozoides separados de porcino en programas de IA

Mientras que en la industria bovina está muy extendido el uso comercial de dosis seminales de espermatozoides separados (Knox y cols., 2014), su empleo en la especie porcina aún no se ha establecido de forma comercial. La razón principal es que en esta especie son necesarias dosis de IA con un alto número de espermatozoides que, cuando hablamos de espermatozoides separados, son difíciles de conseguir en un plazo de tiempo razonable con la tecnología actualmente disponible, la citometría de flujo (Rath y cols., 2013). Ante esta situación se han desarrollado estrategias para poder

realizar inseminaciones efectivas con un bajo o muy bajo número de espermatozoides separados (Vázquez y cols., 2008). En este sentido, la inseminación laparoscópica permite alcanzar tasas de fertilidad superiores al 80% y tamaños de camada próximo a 11 lechones empleando tan solo entre 3 y 6 millones de espermatozoides separados por cerda y ciclo (Del Olmo y cols., 2014). Estos resultados posibilitan que la tecnología de separación espermática en poblaciones X e Y mediante citometría de flujo como método para predecir el sexo de la descendencia se torne potencialmente aplicable desde un punto de vista práctico en la industria porcina.

#### 4.2.- Factores limitantes de la técnica de citometría de flujo para separar eficientemente espermatozoides de porcino en poblaciones X e Y

Como se ha señalado anteriormente, la citometría de flujo es actualmente la única tecnología válida para separar espermatozoides en poblaciones de X e Y. En los últimos años, se han realizado mejoras significativas en todas las etapas implicadas en el proceso de separación espermática haciendo de la citometría de flujo un método cada día más eficiente (Parrilla y cols., 2005; Vázquez y cols., 2005; García y cols., 2007; Vallorani y cols., 2010; Xia y cols., 2012; Del Olmo y cols., 2013). Sin embargo, todavía hay limitaciones que subsanar y que merman la eficiencia del sistema. Una cuestión fundamental, aún no resuelta, es la variabilidad entre verracos o entre eyaculados en la eficiencia de la separación de sus espermatozoides en poblaciones X e Y (Parrilla y cols., 2012), la cual se manifiesta básicamente por diferencias entre eyaculados en la capacidad de poder distinguir con suficiente nitidez las dos poblaciones de espermatozoides en el histograma, y que estaría relacionada con diferencias en la capacidad del fluorocromo H-42 para unirse al ADN de los espermatozoides (Clulow y cols., 2012). Esta variabilidad individual entre verracos o eyaculados, que también ha sido evidenciada en caballos (Clulow y cols., 2009), toros (Burroughs y cols., 2013) y perros (Rodenas y cols., 2013), era previsible dado que la misma se ha observado en otras biotecnologías espermáticas tales como la refrigeración (Kommissrud y cols., 2002), la criopreservación (Roca y cols., 2006) o incluso la fertilización *in vitro* (Gil y cols., 2008). En el caso concreto de la criopreservación, se ha demostrado que los

espermatozoides de una cierta población de verracos ubicados en centros de IA muestran de manera recurrente mala congelabilidad (Roca y cols., 2006). A la vista de estos hechos es oportuno también preguntarse si todos los verracos que son adecuados para participar en programas de IA convencional, lo son también para entrar en programas de preselección del sexo de la descendencia por citometría de flujo. Resolver esta cuestión es propósito de la presente Tesis Doctoral.

Los factores responsables de esta variabilidad entre verracos y/o eyaculados en la separación espermática todavía no son completamente conocidos. Se plantea la hipótesis de que características inherentes al eyaculado podrían ser las responsables (Clulow y cols., 2009; Burroughs y cols., 2013; Rodenas y cols., 2013). En este sentido, en la especie bovina, Burroughs y cols. (2013) proponen que la concentración espermática del eyaculado sería uno de los factores ya que observan que los eyaculados con una concentración menor de  $1 \times 10^9$  espermatozoides por mL presentan una baja eficiencia en el procedimiento de separación por citometría de flujo, lo cual asocian a la mayor proporción de PS presente en dichos eyaculados; PS que dificultaría la entrada del fluorocromo H-42 en los espermatozoides (Burroughs y cols., 2013). Determinar de qué forma las características del eyaculado influyen en la capacidad de los espermatozoides de porcino para soportar el proceso de separación espermática, y cómo dichas características contribuyen a la supuesta variabilidad entre verracos o entre eyaculados del mismo verraco, es también uno de los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral.

#### 4.3.- Influencia del plasma seminal en el procedimiento de separación espermática por citometría de flujo en porcino

El procedimiento de separación espermática mediante citometría flujo, implica varias etapas que pueden alterar la funcionalidad espermática (Garner y cols., 2013). Añadir PS a los medios que diluyen a los espermatozoides durante el proceso de separación ha sido una de las medidas estratégicas utilizadas para minimizar dichas alteraciones (de Graaf y cols., 2008). Sin embargo, actualmente no hay un consenso acerca de cómo el PS puede influir sobre los rendimientos de la técnica. En toros, se

creía inicialmente que el PS adicionado a los diluyentes empleados en el proceso de separación tenía un papel beneficioso sobre la posterior viabilidad y motilidad de los espermatozoides separados (Garner y cols., 2001). Sin embargo, Burroughs y cols. (2013) han demostrado recientemente que la presencia del PS durante las etapas de incubación con el fluorocromo H-42 y durante la separación disminuye las tasas de separación y el porcentaje de espermatozoides vivos y orientados. En verracos, un efecto beneficioso del PS fue observado cuando se incluyó como aditivo del diluyente empleado para la incubación de los espermatozoides con el fluorocromo H-42 (Catt y cols., 1997) o del diluyente utilizado para la recogida de los espermatozoides ya separados (Maxwell y cols., 1997). Sin embargo, nada conocemos del rol desempeñado por el PS propio del eyaculado en la separación espermática. Los resultados alcanzados en toros generan dudas de cómo la elevada proporción de PS propio del eyaculado de porcino puede influir en el proceso de separación espermática por citometría de flujo. Más aún teniendo en cuenta que a dicho PS se le atribuye parte de la responsabilidad de la variabilidad individual observada en la separación espermática en toros (Burroughs y cols., 2013) y que en la especie porcina dicho PS puede variar en composición según el origen del mismo, bien procedente de todo el eyaculado o de fracciones concretas del mismo. Además, para la separación espermática, al igual como ocurría para la criopreservación, los espermatozoides deben permanecer diluidos en su propio PS durante varias horas ya que los centros de IA, donde se recogen los eyaculados, están más o menos alejados de los laboratorios de separación espermática, cuyo número es, por otra parte, muy escaso en la actualidad. En base a estas dudas, evaluar cómo el PS propio del eyaculado y cómo un tiempo largo de incubación de los espermatozoides en dicho PS antes del procedimiento de separación influyen en la eficiencia de la técnica es otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral.

#### 4.4.- Conservación de los espermatozoides de porcino separados en poblaciones X e Y

El éxito en la conservación de los espermatozoides separados es fundamental para su aplicación comercial en la industria porcina dadas las peculiaridades de los programas de IA en esta especie y la distancia entre el laboratorio de separación y las granjas de producción ya de por sí habitualmente muy

dispersas geográficamente (Knox, 2014). Por razones prácticas, la criopreservación sería el procedimiento idóneo de conservación, el cual, además, mejoraría la rentabilidad de esta tecnología (Rath y Johnson, 2008). Sin embargo en la actualidad no existe un protocolo eficaz que permita criopreservar los espermatozoides separados de porcino manteniendo una capacidad fecundante aceptable (Bathgate, 2008). La conservación en refrigeración a 15-17 °C, tal y como se realiza habitualmente con las dosis de semen refrigerado ampliamente empleadas en los programas de IA porcina, es la alternativa más lógica. No existen demasiados estudios que hayan evaluado cuanto tiempo pueden mantener la capacidad fecundante los espermatozoides de porcino conservados en refrigeración. Entre los pocos estudios existentes se ha comprobado su conservación durante 24 h no altera en demasía su calidad y funcionalidad (Spinaci y cols., 2010). Sin embargo, 24 h no es suficiente tiempo para garantizar una correcta aplicación comercial. También es propósito de esta Tesis Doctoral elucidar si los espermatozoides separados de porcino son capaces de mantener su calidad y funcionalidad por tiempos más prolongados cuando son conservados en refrigeración.

# BIBLIOGRAFÍA



- Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Brèque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 2008;70:1251-1259.
- Barrabes Aneas S, Gary BG, Bouvier BP. Collectis® automated boar collection technology. *Theriogenology* 2008;70:1368-1373.
- Bathgate R. Functional integrity of sex-sorted, frozen-thawed boar sperm and its potential for artificial insemination. *Theriogenology* 2008;70:1234-1241.
- Bolarín A, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Hernández M, Vázquez JM, Martínez EA. Dissimilarities in sows ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology* 2006;65:669-680.
- Burroughs CA, Graham JK, Lenz RW, Seidel Jr GE. Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm. *Theriogenology* 2013;79:551-557.
- Caballero I, Vázquez JM, García EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martínez EA. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* 2008;70:1352–1355.
- Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, del Olmo D, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reprod Domest Anim* 2012; 47:12-21.
- Catt SL, O'Brien JK, Maxwell WMC, Evans G. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 1997;32:251–258.
- Clulow JR, Evans G, Morris LH, Maxwell WM. Factors influencing the “sortability” of stallion spermatozoa into X- and Y-chromosome bearing populations. *Anim Reprod Sci* 2009;113:220-228.
- Clulow JR, Buss H, Evans G, Sieme H, Rath D, Morris LHA, Maxwell WMC. Effect of staining and freezing media on sortability of stallion spermatozoa and their post-thaw viability after sex-sorting and cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 2012;47:1-7.
- De Graaf SP, Leahy T, Marti J, Evans G, Maxwell WMC. Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation. *Theriogenology* 2008;70:1360-1363.

Del Olmo D, Parrilla I, Gil MA, Maside C, Tarantini T, Angel MA, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM. Handling of boar spermatozoa during and after flow cytometric sex-sorting process to improve their in vitro fertilizing ability. *Theriogenology* 2013;80:350-356.

Del Olmo D, Parrilla I, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Angel MA, Tarantini T, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, Roca J, Vaquez JM, Martinez EA. Successful laparoscopic insemination with a very low number of flow cytometrically sorted boar sperm in field conditions. *Theriogenology* 2014;81:315-320.

Didion BA, Braun GD, Duggan MV. Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim Reprod Sci.* 2013;137:189-96.

Eriksson BM, Petersson H, Rodriguez-Martinez H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology* 2002;58:1065-1079.

Garcia EM, Vazquez JM, Parrilla I, Calvete JJ, Sanz L, Caballero I, Roca J, Vazquez JL, Martinez, EA. Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 2007;68:771-778.

Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, DeJarnette JM, Allen CH. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology* 2001;56:31–40.

Garner DL, Evans KM, Seidel GE. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *Methods Mol Biol* 2013;927:279-295.

Gerrits RJ, Lunney JK, Johnson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer GA, Dobrinsky JR. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology* 2005;63:283-299.

Gil MA, Almiñana C, Roca J, Vázquez JM, Martinez EA. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. *Theriogenology* 2008;70:1260-1268.

Guthrie HD, Welch GR. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm, *Theriogenology* 2005;63:396-410.

Hernandez M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA, Vazquez JM, Martinez EA. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J Androl* 2007;28:689-697.

Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 1989;41:199-203.

- Johnson LA, Schulman JD. The safety of sperm selection by flow cytometry. *Hum Reprod* 1994;9:758-759.
- Johnson LA, Rath D, Vazquez JM, Maxwell WMC, Dobrinsky JR. Pre-selection of sex in swine for production: current status of the process and application. *Theriogenology* 2005; 63:615-24.
- Juarez JD, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. Boar semen can tolerate rapid cooling rates prior to freezing. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:681-690.
- Leahy T, Gadella BM. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 2011;142:759-778.
- Knox RV. The current value of frozen-thawed boar semen for commercial companies. *Reprod Domest Anim* 2011;46:4-6.
- Knox RV. Impact of Swine Reproductive Technologies on Pig and Global Food Production. In *Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production*. Springer New York. 2014:131-160.
- Kommissrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet Scand* 2002;43:49-55.
- Koziorowka-Gilun M, Koziorowski M, Strzezek J, Fraser L. Seasonal changes in antioxidant defense systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reprod Biol* 2011;11:37-47.
- Mann T, Lutwak-Mann C. Male reproductive function and semen. Springer-Verlag, Berlin. 1981:495.
- Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1997;8:1165-1178.
- Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui Rel-H, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil* 2007;64:13-38.
- Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma. Isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C. *Acta Biochim Pol* 2011;58:171-177.
- Niemann H, Kuhla B, Flachowsky G. Perspectives for feed- efficient animal production. *J Anim Sci* 2011;89:4344-4363.

OECD-FAO Agricultural Outlook. 2013. doi: 10.1787/agr\_outlook-2013-en.

Okazaki T, Abe S, Yoshida S, Shimada M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology* 2009;71:491-498.

Okazaki T, Shimada M. New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim Sci J* 2012;83:623-629.

Parrilla I, del Olmo D, Sijses L, Martinez-Alborcia MJ, Cuello C, Vazquez JM, y cols. Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques. *Anim Reprod Sci* 2012;132:66-73.

Pursel VG, Johnson SA, Shuman LL. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci* 1973;37:532-535.

Rath D, Johnson LA. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod Domest Anim* 2008;43:338-346.

Rath D, Moench-Tegeder G, Taylor U, Johnson LA. Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 2009;71:22-29.

Rath D, Barcikowski S, de Graaf S, Garrels W, Grossfeld R, Klein S, Knabe W, Knorr C, Kues W, Meyer H, Michl J, Moench-Tegeder G, Rehbock C, Taylor U, Washausen S. Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction* 2013;145:R15-R30.

Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 2006;84:2692-2699.

Roca J, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod Domest Anim* 2011;46:79-83.

Rodenas C, Lucas X, Tarantini T, Del Olmo D, Roca J, Vazquez JM, Parrilla I. The effects of Hoechst 33342 staining and the male sample donor on the sorting efficiency of canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2013;49:115-121.

Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Calvete JJ. The physiological roles of the boar ejaculate. *Soc Reprod Fertil* 2009;66:1-21.

Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Martinez EA, Sanz L, Roca J, Vazquez JM, Calvete JJ. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *J Reprod Immunol* 2010;84:57-65.

Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 2011;66:11-22.

Rodriguez-Martinez, H, Peña FV. Semen technologies in domestic species. *Animal Frontiers* 2013;3:26-33.

Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, Pena FJ, Rodriguez-Martinez H. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology* 2009;71:662-675.

Siqueira AP, Wallgren M, Hossain MS, Johannisson A, Sanz L, Calvete JJ, Rodriguez-Martinez H. Quality of boar spermatozoa from the sperm-peak portion of the ejaculate after simplified freezing in MiniFlatpacks compared to the remaining spermatozoa of the sperm-rich fraction. *Theriogenology* 2011;75:1175-1184.

Spinaci M, Vallorani C, Bucci D, Bernardini C, Tamanini C, Seren E, Galeati G. Effect of liquid storage on sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 2010;74:741-748.

Thurston LM, Watson PF. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryoletters* 2002;23:255-262.

Tomás C, Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, de Mercado E. Effect of the holding time at 15 °C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2014;144:115-121.

Tribout T, Caritez JC, Gruand J, Bouffaud M, Guillouet P, Billon Y, Pery C, Laville E, Bidanel JP. Estimation of genetic trends in French Large White pigs from 1977 to 1998 for growth and carcass traits using frozen semen. *J Anim Sci* 2012;88:2856-2867.

Vadnais ML, Althouse GC. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology* 2011;76:1508-1516.

Vallorani C, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati G. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. *Anim Reprod Sci* 2010;122:58-65.

Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Vazquez JL. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 2003;59:1605-1614.

Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JL. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* 2005;63:536–547.

Waberski D, Weyand A, Seedorf J, Weitze KF. Hygiene measures in boar semen production. *Acta Sci Vet* 2010;38:1-7.

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

Yeste M, Estrada E, Rivera Del Álamo MM, Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17 °C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. *PLoS One* 2014; 9:e90887.





# OBJETIVOS



El propósito general de las investigaciones recogidas en la presente Tesis Doctoral fue mejorar el conocimiento hasta ahora existente acerca de la influencia del plasma seminal propio del eyaculado en la posterior capacidad de los espermatozoides de porcino para soportar la criopreservación o la separación en poblaciones espermáticas X e Y mediante citometría de flujo. Para tal propósito se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la influencia de la incubación pre-congelación de los espermatozoides porcinos en su propio plasma seminal, procedente de todo el eyaculado o de fracciones concretas del mismo, sobre la calidad y funcionalidad espermática a la descongelación (Artículo 1).
2. Identificar la relevancia del verraco y del eyaculado dentro del verraco en la variabilidad existente y reconocida en el procedimiento de separación de los espermatozoides en poblaciones de X e Y por citometría de flujo (Artículo 2).
3. Evaluar la influencia de la incubación de los espermatozoides de porcino antes de la separación en su propio plasma seminal sobre la eficiencia del proceso de separación espermática y sobre la posterior capacidad de conservación en refrigeración de los espermatozoides separados (Artículo 3).



# ARTÍCULO 1



**Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate**

Abstract

Boar bulk ejaculates are now being collected instead of usual sperm-rich fractions (SRF) for artificial insemination purpose. The present study evaluated the influence of holding boar sperm samples before freezing surrounded in their own seminal plasma (SP), from either fractions/portions or the entire ejaculate, on post-thawing sperm quality and functionality. Ejaculates collected as bulk (BE) or as separate (first 10 mL of SRF [P1] and rest of SRF [P2]) from 10 boars were held 24 h at 15-17°C and then frozen. Some bulk ejaculate samples were frozen immediately after collections as Control. In addition, epididymal sperm samples from the same 10 boars were collected post-mortem and extended in SP from P1 (EP1), P2 (EP2) and post SRF (EP3), and also held 24 h before freezing for a better understanding of the influence of SP on boar sperm cryopreservation. The sperm quality (motility, evaluated by CASA, and viability, evaluated by flow cytometry) and functionality (flow cytometry assessment of plasma membrane fluidity, mitochondrial membrane potential and intracellular generation of reactive oxygen species [ROS] in viable sperm) were evaluated at 30, 150 and 300 min post-thaw. Post-thawing sperm quality and functionality of P1 and P2 were similar but higher ( $p < 0.01$ ) than BE samples. Control samples showed higher ( $p < 0.01$ ) post-thaw sperm quality and functionality than BE samples. Post-thawing sperm quality and functionality of EP1 and EP2 were similar but slightly higher ( $p < 0.05$ ) than EP3. These results showed that boar sperm from BE are more cryosensitive than those from the SRF, particularly when held 24 h before freezing, which would be attributable to the cryonegative effects exerted by the SP from post SRF.

Keywords: Ejaculate, epididymis, sperm, seminal plasma, porcine.

**URL:** <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224014001345>

doi:10.1016/j.cryobiol.2014.07.004



# ARTÍCULO 2



**Intra- and inter-boar variability in flow cytometric sperm sex sorting**

**Abstract**

To improve the efficiency of porcine sperm sex sorting using flow cytometry, the aims of the present study were to determine the relevance of inter- and intra-boar variability in sperm sortability and to evaluate the significance of ejaculate semen characteristics in such variability. In addition, the variability among boars in the ability of sex-sorted spermatozoa to survive liquid storage at 15-17 °C was also evaluated. In total, 132 ejaculates collected from 67 boars of different breeds that were housed at an artificial insemination center were used in 3 experiments. X- and Y-chromosome-bearing sperm were simultaneously separated according to the Beltsville sperm sorting technology using a high-speed flow cytometer. In the first experiment, inter-boar variability in the ability of the ejaculated spermatozoa to undergo the flow-based sex-sorting procedure was observed; the ejaculates of nearly 15% of the boars (n = 67) did not exhibit well-defined X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa peaks in the histogram, and the ejaculate sperm concentration demonstrated good predictive value for explaining this variation, as indicated by the area under the ROC curve (0.88,  $p < 0.001$ ). In the second experiment, a certain degree of intra-boar variability was observed only in the boars that showed poor sperm sortability (measured according to the presence or not a well-defined split together with sperm sortability parameters) in the first ejaculate (n = 3). In contrast, boars classified as having good sperm sortability in the first ejaculate (n = 5) maintained this condition in five ejaculates collected over the subsequent five months. In the third experiment, sex-sorted spermatozoa from boars with good sperm sortability (n = 5) remained viable and motile (above 70% in all boars) after 48 h of storage at 15-17 °C, which may facilitate the commercial application of sex-sorted spermatozoa in swine AI programs.

Key words: sperm, sex sorting, variability, liquid storage, boar.

**URL:** [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(14\)00230-1/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(14)00230-1/abstract)

doi:10.1016/j.theriogenology.2014.05.008



# ARTÍCULO 3



**Seminal plasma affects sperm sex-sorting in boars**

**Abstract**

Two experiments were conducted in boar semen samples to evaluate how both holding time (24 h) and the presence of seminal plasma (SP) before sorting affect sperm sortability and the capability of sex-sorted sperm to tolerate liquid storage. Whole ejaculate samples were divided into three aliquots immediately after collection: one was diluted (1:1, v/v) in BTS (50% of SP); the SP of the other two was removed, and the sperm pellets were diluted with BTS + 10% of their own SP (10% SP) or BTS alone (0% SP). The three aliquots of each ejaculate were divided into two portions, one that was immediately processed for sorting and a second that was sorted after 24 h of storage at 15-17°C. In the first experiment, the ability to exhibit well-defined X- and Y-chromosome-bearing sperm peaks (split) in the cytometry histogram and the subsequent sorting efficiency were assessed (20 ejaculates). In contrast to holding time, the SP proportion influenced the examined parameters, as evidenced by the higher number of ejaculates exhibiting split and better sorting efficiency ( $P < 0.05$ ) in semen samples with 0-10% SP compared with those with 50% SP. In a second experiment, the quality (viability, total and progressive motility) and functionality (plasma membrane fluidity and intracellular generation of reactive oxygen species) of sex-sorted sperm were evaluated after 0, 72 and 120 h of storage at 15-17°C (10 ejaculates). Holding time and the SP proportion did not influence the quality or functionality of stored sex-sorted sperm. In conclusion, a holding time as long as 24 h before sorting did not negatively affect sex-sorting efficiency or the capability of sorted boar sperm to tolerate long-term liquid storage. A high proportion of SP (50%) in the semen samples before sorting reduces the number of ejaculates to be sorted and negatively influences the sorting efficiency but does not affect the capability of sex-sorted sperm to tolerate liquid storage.

Keywords: sperm sex-sorting, holding time, seminal plasma, boar.

**URL:** <http://www.publish.csiro.au/?paper=RD14088>

doi:10.1071/RD14088



# CONCLUSIONES



1. Los espermatozoides procedentes del eyaculado completo son más sensibles a la criopreservación que aquellos procedentes de la fracción rica del eyaculado. Dicha mayor sensibilidad se asociaría a la presencia del plasma seminal de la fracción post-espermática.

2. El verraco, como individuo, es un factor importante en la variabilidad observada entre los eyaculados de porcino en la capacidad de sus espermatozoides para soportar el procedimiento de separación en poblaciones X e Y mediante citometría de flujo. Los verracos que muestran una buena capacidad de separación espermática en un primero eyaculado mantienen dicha condición en los siguientes eyaculados.

3. La pre-incubación de los espermatozoides de porcino en una alta proporción de su propio plasma seminal menoscaba la eficiencia del proceso de separación espermática en poblaciones X e Y mediante citometría, pero no perjudica la posterior capacidad de los espermatozoides separados para soportar un largo almacenamiento en refrigeración a 15-17 °C.



# ABREVIACIONES



BE: Eyaculado completo (bulk ejaculate)

BSA: Albúmina de suero bovino (Bovine serum albumin)

BTS: Beltsville Thawing Solution

CASA: Sistema de análisis espermático computarizado (computer-assisted sperm analysis)

CM-H<sub>2</sub>DCFDA: 5-(and-6) chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate acetyl ester

EC: Eyaculado completo

FDA: Colorante alimentario (food dye)

FITC-PNA: Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (*Arachis hypogaea*)

FRE: Fracción rica en espermatozoides

FSC: Dispersión frontal (forward scatter)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogeno

H-42: Hoechst 33342

IA: Inseminación artificial

IP: Ioduro de propidio

M-540: Merocyanine 540

NaCl: Cloruro de sodio

PBS: Solución salina tampón fosfato (phosphate-buffered saline)

PS: Plasma seminal

PVC: Policloruro de vinilo (Polyvinyl chloride)

ROC: Característica Operativa del Receptor (Receiver Operating Characteristic)

ROS: Sustancias Oxígeno Reactivas (Reactive Oxygen Species)

SP: Seminal Plasma

SRF: Fracción rica en espermatozoides (sperm-rich fraction)

SSC: Dispersión lateral (side scatter)

TFM: Tubos fotomultiplicadores

TGC-y: Tris-glucosa-ácido cítrico + yema de huevo)

TGC-yge: TGC-y + glicerol + Equex STM

TTG: Tes + Tris + Glucosa

# APÉNDICES



## APÉNDICE A - PROTOCOLO DE CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA

### Muestra:

- Espermatozoides provenientes del eyaculado completo, de fracciones del mismo o del epidídimo, según diseño experimental.

### Procesado del semen:

- Muestras de semen del eyaculado completo o de sus fracciones fueron diluidas 1:2 en BTS. Las muestras del epidídimo fueron diluidas en BTS + plasma seminal, según diseño experimental.
- Las muestras de semen diluidas fueron congeladas inmediatamente o equilibradas a 17 °C durante 24 h antes de la congelación, según diseño experimental.

### Congelación:

- Las muestras seminales fueron centrifugadas (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau, Germany, **Fig. 1A**) a 2400 x g durante 3 min.



**Figura 1A.** Centrífuga Megafuge 1.0 R empleada para centrifugar el semen como paso previo del protocolo de congelación espermática.

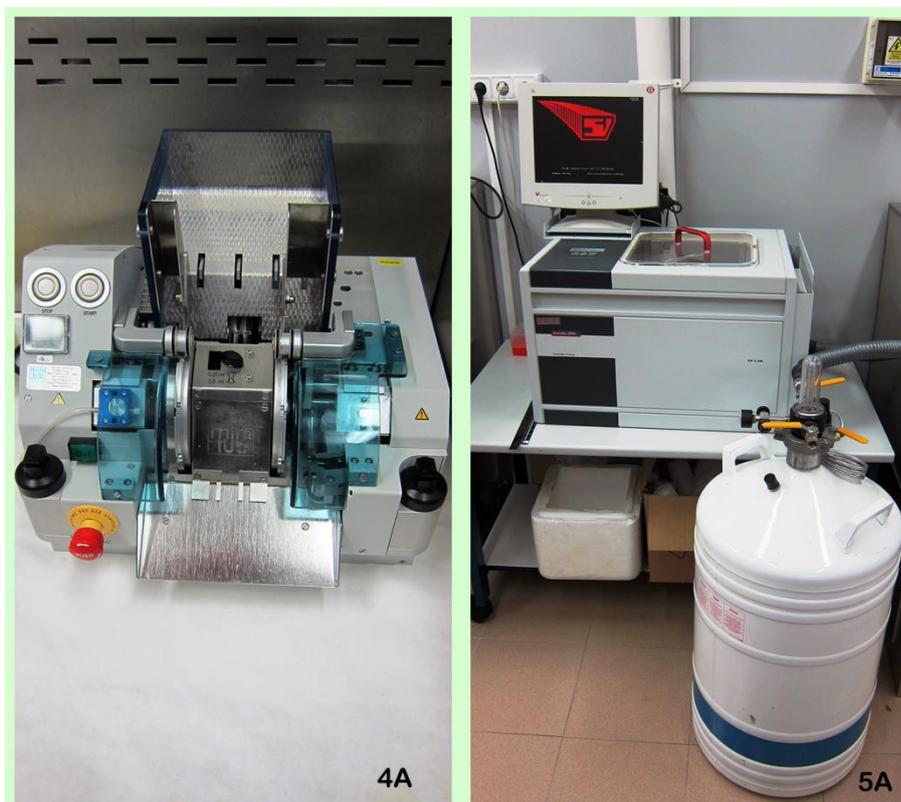
- El sobrenadante fue descartado y los espermatozoides presentes en el pellet resultante fueron diluidos con TGC-y (80% Tris-glucosa-ácido cítrico + 20% yema de huevo) hasta una concentración de  $1500 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

- Las muestras espermáticas diluidas fueron refrigeradas hasta 5 °C a una velocidad de 0'08°C/min. Una vez a 5 °C fueron re-diluidas en TGC-yge (89'5% TGC-y + 9% glicerol + 1'5% Equex STM) hasta alcanzar una concentración de  $1000 \times 10^6$  espermatozoides/mL (**Fig. 2A y 3A**).



**Figura 2A/3A.** Descenso de la temperatura de las muestras espermáticas a 5°C.

- A continuación las muestras espermáticas fueron envasadas en pajuelas de PVC de 0'5 mL (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) mediante una envasadora automática (MPP Uno, Minitüb, **Fig.4A**) y, posteriormente, congeladas mediante un biocongelador programable (IceCube 1810, Minitüb, **Fig.5A**).



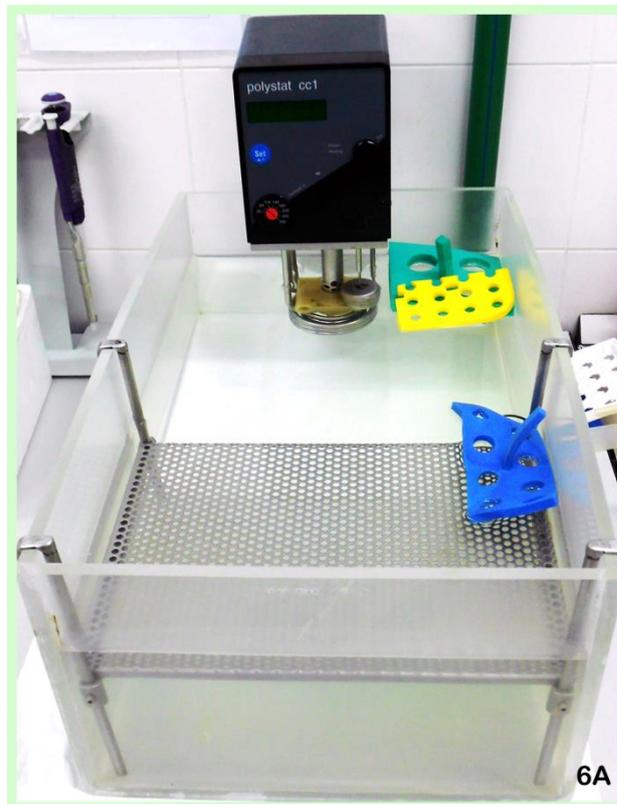
**Figura 4A.** Envasadora automática utilizada para el llenado de las pajuelas de 0'5 mL.

**Figura 5A.** Biocongelador IceCube 1810 utilizado para la congelación de las muestras espermáticas.

- Curva de congelación utilizada: de +5 a -5°C a una velocidad de -6 °C/min, de -5 a -80 °C a una velocidad de -40 °C/min, se mantienen durante 30 s a -80°C y, por último, de -80 a -150 °C a una velocidad de -70 °C/min.
- Las pajuelas congeladas fueron almacenadas en tanques de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

### **Descongelación:**

- La descongelación se realizó sumergiendo las pajuelas, de manera individual, en un baño termostatzado (Polystat cc1, Schott Ibérica, S.A., Barcelona, España, **Fig. 6A**) a 37 °C y agitándolas vigorosamente durante 20 s.
- Una vez descongeladas, el contenido de cada pajuela fue diluido con BTS (1:1, vol:vol).



**Figura 6A.** Baño termostatzado utilizado para la descongelación de las muestras espermáticas.

## APÉNDICE B- PROTOCOLO DE SEPARACIÓN ESPERMÁTICA

### Muestra:

- Muestras de semen procedentes del eyaculado completo o de la fracción rica del mismo, según el experimento.

### Procesado de las muestras de semen:

- Las muestras de semen se transportaron en cajas de poliespan a una temperatura de entre 20 – 23 °C desde el centro de inseminación (AIM Ibérica, Calasparra, Murcia) al laboratorio de Andrología del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia, donde llegaron dentro de la primera hora después de la recogida y donde fueron procesadas inmediatamente o conservadas en refrigeración a 17 °C durante 24 h antes de su procesamiento.

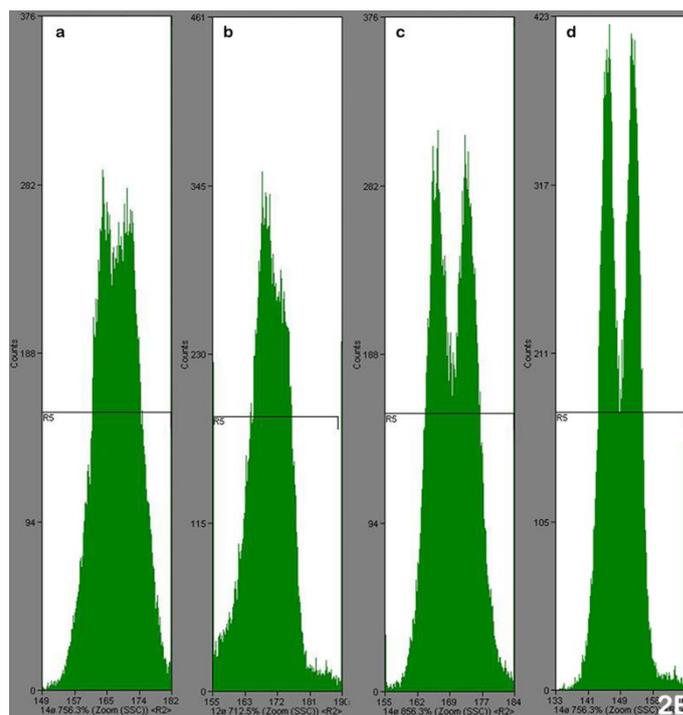
### Separación espermática mediante citometría de flujo:

- Para la separación de los espermatozoides X e Y en base a su contenido de ADN se utilizó un citómetro de flujo separador de alta velocidad (Dako Moflo<sup>®</sup> SX, Colorado Inc., Fort Collins, CO, EEUU, **Fig. 1B**) trabajando a un presión de 40 p.s.i y equipado con un láser ultravioleta sólido (351-364nm; Spectra Physics<sup>®</sup> Lasers, Terra Bella Avenue, Mountain View, California) con un potencia de 175mW.



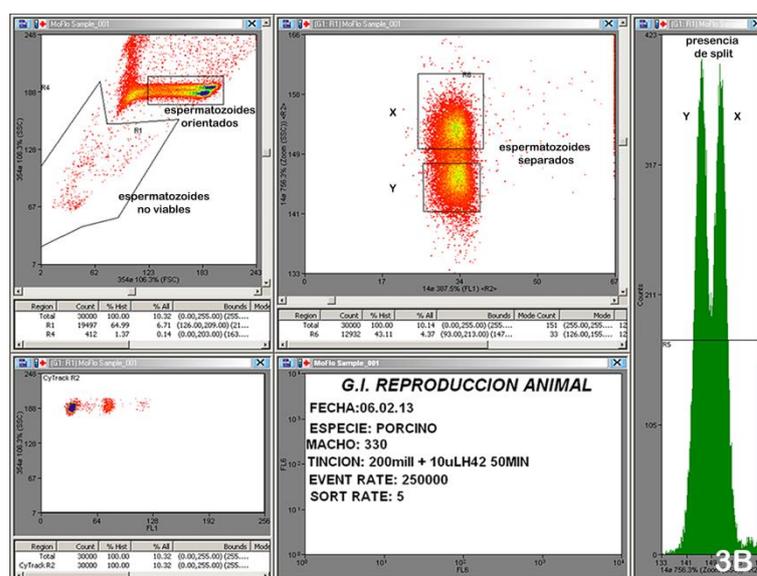
**Figura 1B.** Citómetro de flujo separador Dako Moflo SX ubicado en el Departamento de Obstetricia y Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

- Los eyaculados se dividieron en alícuotas de 1 mL conteniendo cada una de ellas 200 millones de espermatozoides. A cada una de las alícuotas se le adicionaron 10 ó 15  $\mu\text{L}$  (según diseño experimental) del fluorocromo Hoechst 33342 (5 mg/mL [9 mM]) y se incubaron en oscuridad a 35 °C durante 50 min.
- Tras la tinción y antes de proceder a su paso por el citómetro, las alícuotas se filtraron mediante un filtro de nylon con 30  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se les añadieron 2  $\mu\text{l}$  de colorante FDA (food dye 1 mg/mL; SortEnsure™ FD&C 40 solution).
- Los espermatozoides X e Y fueron recogidos simultáneamente en tubos Falcon estériles de 50 mL previamente tratados con BSA 1% (peso/volumen en PBS), los cuales contenían 2,5 mL del medio de recogida TTG (Tes 218 mM; Tris 56,1 mM; Glucosa 33,2 mM) + 2% de yema de huevo para cada 20 millones de espermatozoides recogidos.
- En todas las muestras de semen utilizadas se evaluó, inicialmente, la capacidad para identificar y diferenciar las poblaciones de espermatozoides X e Y en el histograma (presencia de split, **Fig. 2B**).



**Figura 2B.** Ejemplos de histogramas con diferentes calidades de split. (a, b) imposibilidad de diferenciar las poblaciones de espermatozoides X e Y; (c, d) splits bien definidos, con lo que es posible identificar y diferenciar con facilidad las poblaciones de espermatozoides X e Y.

- En aquellas muestras consideradas aptas para el procedimiento (presencia de split) la eficiencia de separación se evaluó en función de los siguientes parámetros: (1) porcentaje de espermatozoides no viables (teñidos con FDA), (2) porcentaje de espermatozoides orientados (aquellos espermatozoides que reciben el impacto del láser de forma correcta emitiendo la fluorescencia adecuada), (3) porcentaje de espermatozoides separados y finalmente (4) la velocidad de separación (número de espermatozoides X o Y separados por segundo) **Fig.3B**.



**Figura 3B.** Definición de las poblaciones: Espermatozoides orientados, no viables, separados (X e Y) y presencia de split.

### Procesado de las muestras de espermatozoides X e Y:

- Las muestras de espermatozoides X e Y fueron centrifugadas (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech®) a 3000 x g, durante 4 min a 21°C y el pellet fue diluido hasta una concentración final de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL en BTS para su conservación en refrigeración a 17 °C.

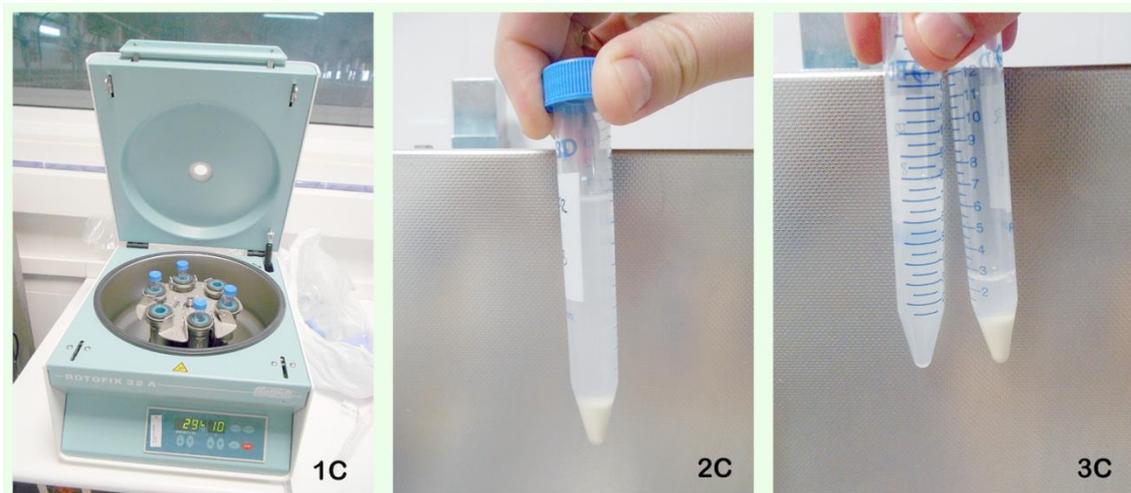
## APÉNDICE C- PROCESADO DEL PLASMA SEMINAL

### Muestra:

- Eyaculado completo o fracciones del mismo, según experimento.

### Obtención del plasma seminal:

- Se realizó una primera centrifugación (Rotofix 32 A, Hettich Zentrifugen<sup>®</sup>, Germany; **Fig. 1C**) del eyaculado o fracción a 1.500 x g durante 10 min a temperatura ambiente, recuperándose el sobrenadante (**Fig. 2C y 3C**).
- Dicho sobrenadante fue de nuevo centrifugado, también a 1.500 x g durante 10 min a temperatura ambiente, recuperándose el sobrenadante final.



**Figura 1C.** Centrífuga Rotofix 32 A empleada para centrifugar el semen para obtención del plasma seminal.

**Figuras 2C/3C.** Plasma seminal resultante de la centrifugación de las muestras espermáticas.

### Conservación de las muestras de plasma seminal:

- El plasma seminal se depositó en criotubos previamente identificados, los cuales se conservaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.
- Los criotubos fueron descongelados a temperatura ambiente.

## APÉNDICE D- PROCESADO DEL EPIDÍDIMO

### Muestra:

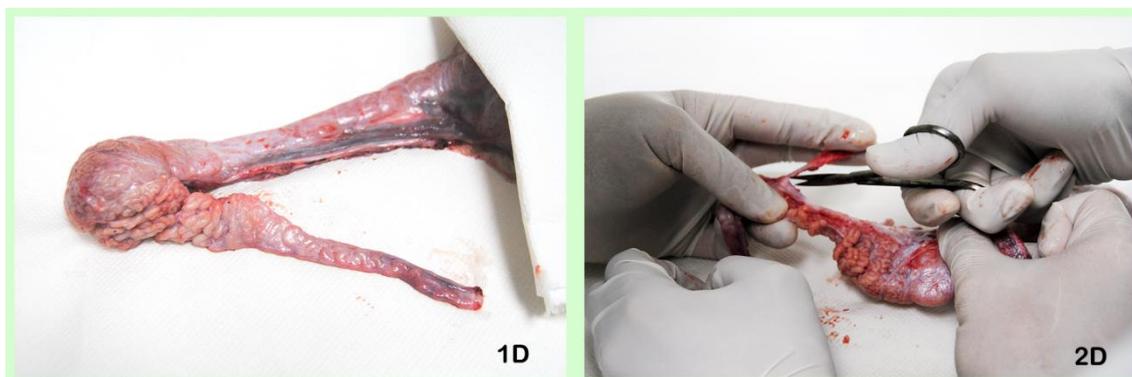
- Epidídimos recuperados post mortem.

### Obtención de los epidídimos:

- Sacos escrotales recogidos en matadero inmediatamente después del sacrificio del verraco a los que se les pinzaban los vasos sanguíneos para evitar que la sangre contaminara el contenido de los epidídimos. A continuación, el contenido escrotal (testículo y epidídimo) se lavaron con solución salina (NaCl 0'9%) para eliminar cualquier contaminación.
- Los sacos escrotales limpios fueron colocados en bolsas de plástico estériles con un mínimo de aire y correctamente identificados.
- Posteriormente, fueron transportados al laboratorio en contenedores aislados mantenidos a 20-23 °C, llegando al laboratorio dentro de los 30 min después de la recogida.

### Obtención de los espermatozoides del epidídimo:

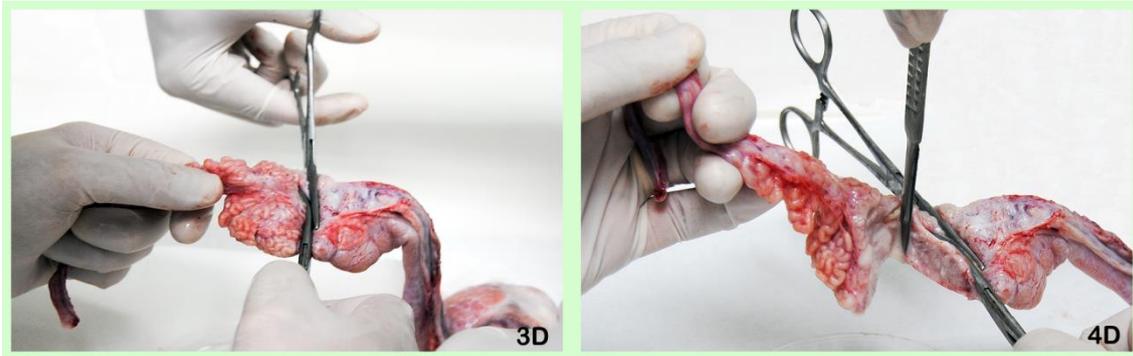
- En el laboratorio, el epidídimo y conducto deferente fueron separados de los testículos (**Fig. 1D**).
- A continuación se realizó una cuidadosa disección del epidídimo, retirando el exceso de tejido conectivo, para mejor visualización de la superficie y disminuir la tortuosidad del epidídimo (**Fig. 2D**).



**Figura 1D.** Epidídimo y conducto deferente completamente aislados del testículo.

**Figura 2D.** Limpieza de todo tejido conectivo del epidídimo.

- Una vez limpio, se pinzó entre la cola y el cuerpo del epidídimo (**Fig. 3D**). La cola del epidídimo (juntamente con el conducto deferente) se separaron del resto del epidídimo (**Fig. 4D**).



**Figura 3D.** Pinzas próximas a la unión de la cola y el cuerpo del epidídimo.

**Figura 4D.** Utilización de un bisturí para la separación de la cola del epidídimo y conducto deferente del resto del epidídimo.

- Una aguja hipodérmica (21G 0'8 x 25 mm) con punta roma se conectó a una jeringa de 50 mL llena de aire que se insertó en el extremo abierto del conducto deferente.
- El contenido de la cola del epidídimo se recuperó perfundiendo el aire presente en la jeringa en dirección retrógrada desde el conducto deferente a través de la cola del epidídimo. Posteriormente, un pequeño volumen (1 mL) de diluyente (BTS) también fue perfundido para un mejor lavado de la cola del epidídimo (**Fig. 5D**).
- El contenido de los dos epidídimos se mezcló y se procesó de acuerdo con el diseño experimental.



**Figura 5D.** Obtención del contenido de la cola del epidídimo.



## APÉNDICE E- ANÁLISIS DE LA CALIDAD Y FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUJO

### Muestra:

- Espermatozoides criopreservados o sexados, según experimento.

### Procesado de las muestras:

- Diluidas en BTS a  $30 \times 10^6$  espermatozoides/mL (semen criopreservado) o a  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL (semen sexado).
- A continuación, dichas muestras fueron re-diluidas en PBS (en proporción variable según determinación) e incubadas con los fluorocromos correspondientes a 37 °C.

### Descripción de los procedimientos:

- Parámetro evaluado: partículas que contienen ADN; Fluorocromo: Hoechst 33342 (H-42); Característica: se une al ADN en todas las células; Señal: Pacific Blue; Fabricante: Sigma Aldrich; Número de catálogo: B2261.
- Parámetro evaluado: Viabilidad espermática; Fluorocromo: ioduro de propidio (IP) Característica: penetra y se une al ADN en los espermatozoides con la membrana plasmática dañada; Señal: ioduro de propidio; Fabricante: Molecular Probes; Número de catálogo: P3566.
- Parámetro evaluado: detección del acrosoma reaccionando y/o reaccionado; Fluorocromo: Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (Arachis hypogaea; FITC-PNA) Característica: se une a la membrana acrosomal externa de los espermatozoides; Señal: Fluorescein isothiocyanate (FITC); Fabricante: Sigma Aldrich; Número de catálogo: L7381.
- Parámetro evaluado: desestabilización de la membrana plasmática; Fluorocromo: Merocyanine 540 (M-540); Característica: nivel de desorganización de los fosfolípidos de la membrana; Señal: Merocyanine 540; Fabricante: Molecular Probes; Número de catálogo: M24571.
- Parámetro evaluado: cambios tempranos en la permeabilidad de la membrana plasmática; Fluorocromo: YO-PRO-1; Característica: penetra y se une al ADN en los espermatozoides que sufren cambios relacionados con la apoptosis (alteraciones de la membrana); Señal: YO-PRO-1; Fabricante: Molecular Probes; Número de catálogo: Y3603.
- Parámetro evaluado: Generación de Sustancias Oxígeno Reactivas (ROS); Fluorocromo: 5-(and-6) chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA); Característica: indicador celular de la producción intracelular de peróxido de

hidrógeno ( $H_2O_2$ ); Señal: 2',7'-dichloro-fluorescein (DCF); Fabricante: Molecular Probes; Número de catálogo: C6827.

- Parámetro evaluado: Actividad mitocondrial; Fluorocromo: Mitotracker Deep Red 633; Característica: difunde pasivamente a través de la membrana plasmática y se acumula y tiñe las mitocondrias activas; Señal: Mitotracker Deep Red; Fabricante: Molecular Probes; Número de catálogo: M22426.

### **Citometro de flujo:**

- Modelo: BD FACSCanto II (**Fig. 1E**).
- Fabricante: Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA.



**Figura 1E.** Citómetro de flujo analizador FACSCantoII, Becton Dickinson®

### **Configuración y ajustes del citometro de flujo:**

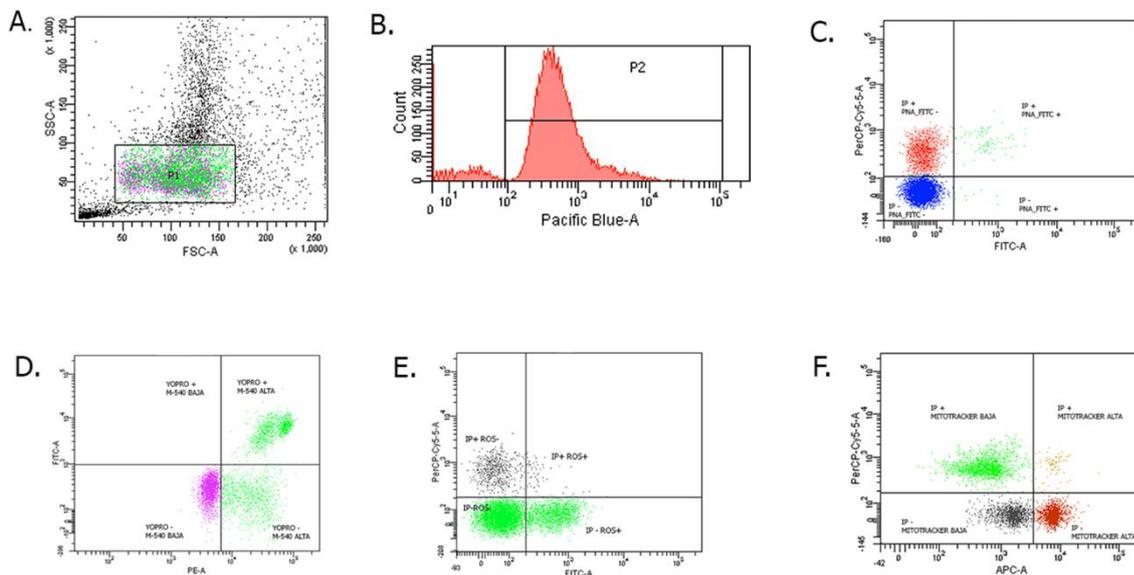
- Flujo celular: cubeta de flujo de cuarzo rectangular de 180 x 430  $\mu$ m.
- Fuente de luz: Opción de 8 colores con 3 láseres; 405-nm, 488-nm y 633-nm. Configuración del láser: separados espacialmente en una pieza elíptica con 9 x 65  $\mu$ m.
- Filtros ópticos: La configuración óptica incluye un octógono y dos conjuntos de detectores trígono. El octógono contiene cinco tubos fotomultiplicadores (TFM) y detecta la luz del láser azul. Uno TFM en el octógono recoge las señales de dispersión lateral (SSC). Ambos trígonos contienen dos TFM. Uno detecta la luz del láser rojo y el otro detecta la luz del láser violeta.
- Detectores ópticos: El detector de voltajes se han establecido a: FSC=502V; SSC=504V; Pacific blue= 326-425V; PerCP-Cy-5-5= 400V; FITC= 378-493V; PE= 473V; APC=530V.

Detector FSC: Fotodiodo con 488/10 BP; Detector SSC: TFM con 488/10 BP; Detectores de fluorescencia: 8 TFMs en una configuración 4-2-2.

- Descripción de la Compensación: Las Compensaciones se realizaron utilizando el software BD FACSDiva.

### Descripción de la selección de los datos:

- Los eventos (10.000 por muestra) fueron registrados por la señal de dispersión frontal (FSC) y la de dispersión lateral (SSC). Los espermatozoides fueron identificados y seleccionados basados en la fluorescencia del H-42 (contenido de ADN). Distintas poblaciones de espermatozoides fueron identificadas usando el IP, FITC-PNA, YO-PRO-1, M-540, CM-H<sub>2</sub>DCFDA y Mitotracker Deep Red según la característica que se mide (**Fig. 2E**).



**Figura 2E:** Estrategia de selección de las poblaciones espermáticas utilizada en la citometría de flujo para evaluación de la calidad y funcionalidad de espermatozoides porcinos tecnológicamente tratados. (A) Ventana del FSC-SSC ajustada para excluir partículas no deseadas; (B) Una ventana (P2) fue utilizada para definir la población de espermatozoides basado en la fluorescencia del H-42 (contenido de ADN); (C) Población de espermatozoides viables exhibiendo las membranas plasmáticas y acrosomal intactas (IP negativo y PNA-FITC negativo); (D) Ventanas para FITC y PE aplicadas en la población de espermatozoides para la detección de espermatozoides viables (YO-PRO-1 negativo) con baja y alta fluidez de la membrana plasmática (fluorescencia de la M-540); (E) Cuatro poblaciones de espermatozoides eran evidentes en las ventanas para PerCP-Cy5-5 y FITC de acuerdo con la generación intracelular de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en espermatozoides viables (IP negativo) o no viables (IP positivo) (F) Población de espermatozoides viables (IP negativo) exhibiendo bajo o alto potencial de la membrana mitocondrial (fluorescencia del Mitotracker).

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>

Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2013 JCR Science Edition

**MARKED JOURNAL LIST**

Abbreviated Journal Title	ISSN	2013 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2013 Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
CRYOBIOLOGY	0011-2240	3064	1.643	1.890	0.248	113	>10.0	0.00338	0.435
REPROD FERT DEVELOP	1031-3613	2549	2.577	2.221	0.475	101	6.8	0.00504	0.618
THERIOGENOLOGY	0093-691X	12505	1.845	2.146	0.369	309	8.5	0.01577	0.532

[Acceptable Use Policy](#)  
 Copyright © 2014 Thomson Reuters.



THOMSON REUTERS

Published by Thomson Reuters