

## EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD DEL PROCESO DE SEPARACIÓN ESPERMÁTICA POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL GANADO PORCINO

Safety of boar sperm selection by flow cytometry

**Parrilla I., Vázquez J.M. y Martínez E.A.**

Dpto. Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, s/n, Murcia 30.041

Autor de referencia: parrilla@um.es

### RESUMEN

La preselección del sexo de la descendencia mediante la separación espermática por citometría de flujo implica la tinción de los espermatozoides con el fluorocromo Hoechst 33342 y el impacto sobre éstos de un láser ultravioleta, dos agentes potencialmente mutagénicos. En este trabajo se realizó un estudio de la eficiencia reproductiva obtenida tras la inseminación de cerdas nacidas a partir de espermatozoides separados y no separados (control) con espermatozoides teñidos con Hoechst 33342 y separados por citometría de flujo. Así mismo, se realizó un estudio fenotípico y citogenético de la descendencia obtenida tras estas inseminaciones. En primer lugar, se evaluó el efecto del procedimiento de separación sobre los parámetros reproductivos. Los análisis citogenéticos se realizaron en metafases linfocitarias procedentes de lechones nacidos tras la inseminación de las cerdas de primera generación con espermatozoides separados y no separados (control). Para ello y tras el cultivo *in vitro* de sangre procedente de estos animales, se recolectaron los linfocitos por centrifugaron, se lavaron con una solución hipotónica, se fijaron y se prepararon las extensiones en portaobjetos. El número de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y de aberraciones cromosómicas (ACs, incluyendo roturas cromosómicas y cromatídicas) por célula fueron evaluadas en 50 metafases, pertenecientes al segundo ciclo de replicación celular *in vitro*, de cada uno de los individuos analizados. Los datos se analizaron mediante ANOVA. Las tasas de partos fueron de un 40% y un 81'2% ( $p < 0.05$ ) en cerdas de primera generación nacidas de espermatozoides separados e inseminadas, a su vez, con espermatozoides separados y no separados respectivamente. Para las cerdas control de esta primera generación, los porcentajes fueron de un 36% y un 82'1% ( $p < 0.05$ ) para espermatozoides separados y no separados respectivamente. No se observaron diferencias entre los grupos para el tamaño de camada. Independientemente del tipo de cerda inseminado, no se observó un aumento significativo ( $p > 0.05$ ) de la frecuencia de ICHs o ACs por célula, en linfocitos pertenecientes a los lechones obtenidos tanto con espermatozoides separados como no separados (segunda generación). Los resultados indican que el proceso de separación por citometría de flujo no posee un efecto mutagénico sobre los espermatozoides de verraco expresado como un aumento en la incidencia de anomalías en la descendencia

obtenida en la segunda generación, así como con un incremento en la frecuencia de ICHs y ACs por célula en linfocitos de estos individuos.

**Palabras clave:** porcino, separación espermática, citometría de flujo, mutagenicidad.

## ABSTRACT

Sex selection by flow cytometry/cell sorting involves the staining of spermatozoa with Hoechst 33342 in combination with the impact of a u.v. laser beam, two potentially mutagenic agents. A livestock breeding efficiency, phenotypic and cytogenetic study after insemination with spermatozoa stained with Hoechst 33342 and sorted spermatozoa of sows born from flow-sorted spermatozoa and sows born from untreated spermatozoa was performed. Firstly the effect of these agents on the reproductive performance on the first generation was evaluated. Cytogenetic study was performed from peripheral blood lymphocytes from piglets born after insemination with flow sorted or unsorted (control) spermatozoa of sows of the first generation. Cells were collected by centrifugation, subjected to hypotonic solution and fixed and dropped onto slides. Sister Chromatid Exchanges (SCEs) and chromosome aberrations (CA: including chromosome and chromatid breaks) per cell were scored in 50 second division metaphase from each donor. Data were analyzed by ANOVA. Reproductive parameters and litters performance of all inseminations performed were also recorded in all groups. Farrowing rates were 40% and 81.2% ( $p < 0.05$ ) in sex-selected sows for sorted and non-sorted spermatozoa and 36% and 82.1% ( $p < 0.05$ ) in control sows for sorted and non-sorted spermatozoa. No differences were observed in the litter sizes. Regardless the type of sow inseminated, no significant increase ( $p > 0.05$ ) of SCE and CA frequencies were observed in piglets born from flow sorted spermatozoa, or from untreated sperm (second generation). The results indicate that no mutagenic effect on spermatozoa expressed as increase in the incidence of abnormalities in the resulting offspring and also as increase in SCEs and CA frequencies on lymphocytes from these individuals, was induced by the flow sorting procedure in the second generation of piglets born.

**Keywords:** swine, sperm sorting, flow cytometry, mutagenic effect.

## 1. INTRODUCCIÓN

La preselección del sexo de la progenie mediante separación espermática por citometría de flujo es, sin duda, uno de los avances más importantes dentro del campo de la biotecnología de la reproducción. Una aceleración en los programas de mejora genética, un incremento en la eficiencia biológica y económica de la producción y una mayor flexibilidad en los sistemas de manejo son algunas de las ventajas que esta técnica podría aportar a las explotaciones ganaderas (Johnson y cols, 2005). En el caso concreto del porcino, la utilización de esta tecnología para la predeterminación del sexo de la descendencia supondría un gran impulso para los programas de mejora genética en esta especie. La producción de machos y hembras de líneas selectas aumentaría su eficiencia y rentabilidad mediante la selección del sexo de

la descendencia. La aplicación de esta técnica en los núcleos de multiplicación porcina sería también ventajosa ya que permitiría producir machos o hembras de acuerdo a las necesidades de producción. De igual manera, la posibilidad de obtener sólo hembras como producto final es algo muy apreciado por el productor incluyendo la posibilidad de eliminar la castración como práctica de manejo en estos núcleos productivos.

El nacimiento de animales del sexo deseado en diferentes especies tras la utilización de espermatozoides X o Y separados por citometría de flujo en combinación con diferentes técnicas de reproducción asistida ha sido descrita por numerosos autores (revisado por Johnson, 2000). Los individuos obtenidos en estos nacimientos se cuentan por miles (incluyendo los pertenecientes a la especie humana) sin observarse un incremento de las malformaciones o

anormalidades fenotípicas (Seidel y Garner, 2002), determinando la aceptación de esta técnica como segura desde el momento en que no existen evidencias que demuestren lo contrario. El único efecto negativo asociado con la utilización de los espermatozoides separados es una reducción del tamaño de camada (Johnson y cols., 1989; Johnson, 1991; Vázquez y cols., 2003) que podría estar asociado o bien a una disminución de la capacidad fecundante de estos espermatozoides (Parrilla y cols., 2005), o bien a una posible pérdida embrionaria durante la gestación, cuya causa podría estar relacionada, entre otras, con un daño en el ADN del espermatozoide. En este sentido, diferentes autores han planteado dudas acerca de la seguridad genética de un proceso que contempla la tinción con Hoechst 33342 junto con el impacto de un láser ultravioleta (Ashwood-Smith, 1994; Munné, 1994).

Teniendo en cuenta que ambos agentes, el Hoechst 33342 y el láser ultravioleta, actúan directamente sobre el espermatozoide, la evaluación de los parámetros reproductivos derivados de las inseminaciones realizadas con estos espermatozoides puede resultar un excelente indicador del posible efecto tóxico del proceso de separación espermática por citometría de flujo sobre los espermatozoides de verraco. Diferentes estudios destinados a comprobar la toxicidad de determinadas sustancias incluyen el análisis de estos parámetros (Valentine y Himmelstein, 2001; Bustos-Obregon y Goicochea, 2002) dándonos una idea de la utilidad de los mismos como bioindicadores del efecto tóxico de las mismas. Además, y según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1993) la aparición de consecuencias adversas a nivel reproductivo pueden ser el reflejo de los efectos tóxicos de un agente sobre el macho o la hembra, o bien estar asociadas con alteraciones del desarrollo durante el periodo embrionario o fetal.

Como complemento a estos estudios de toxicidad, los estudios citogenéticos son necesarios como indicadores de un posible daño en

el ADN. Ensayos de este tipo como el intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) y las aberraciones cromosómicas (ACs) estructurales, incluyendo las roturas cromatídicas y/o cromosómicas, han sido utilizados durante muchos años para evaluar el posible efecto mutagénico y carcinogénico de determinadas sustancias genotóxicas cuando células, animales e incluso seres humanos han sido expuestos a las mismas (Perry y Evans, 1975; Latt y cols., 1981; Albertini y cols., 2000). Los ICHs han sido descritos como un método ideal para la evaluación del potencial genotóxico de sustancias inductoras de daño en el ADN, o que interfieren en el metabolismo o en los mecanismos de reparación de este ADN. Por otro lado, las ACs están más relacionadas con aquellas sustancias que directamente rompen la estructura o alteran gravemente la doble hélice del ADN (Carrano y Natarajan, 1988).

Un estudio realizado recientemente por Parrilla y cols. (2004) acerca del posible efecto mutagénico de estos agentes, el Hoechst 33342 y el láser ultravioleta, sobre los espermatozoides de verraco y sus posibles efectos sobre la descendencia, demuestra la ausencia de efectos genotóxicos *in vivo* de la técnica de separación espermática mediante citometría de flujo en base, no sólo a evidencias fenotípicas, sino también a análisis citogenéticos. Sin embargo y teniendo en cuenta que una de las principales aplicaciones de esta tecnología de preselección del sexo en el ganado porcino sería la obtención de animales de líneas híbridas selectas destinados principalmente a ser utilizados como reproductores en las distintas explotaciones, resulta básico, desde nuestro punto de vista, conocer si existe un efecto acumulativo del proceso de separación por citometría de flujo, sobre el ADN que pudiera expresarse en una reducción del potencial reproductivo de los animales obtenidos, así como en un incremento en la presencia de anormalidades en la descendencia nacida partir de animales cuyo sexo ha sido preseleccionado anteriormente mediante esta técnica y que han

sido inseminadas, a su vez, con espermatozoides sometidos al proceso de separación por citometría de flujo.

El objetivo del presente trabajo es confirmar la seguridad genética de esta técnica de preselección del sexo por citometría de flujo y descartar un efecto acumulativo de la misma en generaciones sucesivas, mediante la evaluación de la capacidad reproductiva de hembras obtenidas a partir de inseminaciones con espermatozoides separados por citometría de flujo (primera generación) así como mediante el análisis fenotípico y citogenético de animales nacidos tras la inseminación de estas hembras (segunda generación).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados en este estudio fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co. (Alconbendas, Madrid), a menos que se especifiquen otros proveedores.

### 2.1. Animales

Todas las experiencias realizadas con animales recibieron la aprobación del Comité Ético para la Experimentación con Animales de la Universidad de Murcia.

Los animales utilizados provenían de una granja comercial localizada en la provincia de Murcia. Los machos y hembras utilizados en la inseminación artificial (IA) fueron animales maduros de razas híbridas. Las cerdas procedían de camadas obtenidas tras la IA con espermatozoides de verraco sometidos al proceso de separación espermática por citometría de flujo, así como de camadas obtenidas a partir de las IA realizadas con espermatozoides no procesados pertenecientes a los mismos verracos. En ambos casos fueron seleccionadas el día de su salida a celo y alojadas en jaulas individuales en naves equipadas con ventilación mecánica. En todos los casos los animales fueron alimentados, con pienso compuesto, de acuerdo a sus

condiciones reproductivas, la disponibilidad de agua fue *ad libitum*.

Los eyaculados utilizados en las inseminaciones procedían de machos maduros sexualmente y de fertilidad comprobada, alojados en parques individuales con ambiente controlado ( $23\pm 2^\circ\text{C}$ ).

Los lechones obtenidos tras las inseminaciones fueron alojados en grupos en lechonerías con ventilación mecánica, alimentados dos veces al día y con disposición de agua *ad libitum*.

### 2.2. Recolección del semen y preparación

Se recogió únicamente la fracción rica de los eyaculados pertenecientes a cinco verracos, mediante la utilización del método manual. Estas fracciones ricas fueron mezcladas y diluidas en el diluyente Beltsville Thawing Solution (BTS, Johnson y cols., 1988) hasta una concentración final de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Inmediatamente después de la dilución se procedió a la evaluación de la calidad de los eyaculados, utilizándose para la realización de esta experiencia solo aquellos que presentaban unos valores mínimos de: viabilidad  $> 80\%$ ; acrosomas Anormales  $< 10\%$ ; morfoanomalías espermáticas  $< 15\%$  (Vazquez y cols., 1997).

Una parte de los espermatozoides diluidos fue conservada ( $22^\circ\text{C}$ ) hasta el momento de su utilización en las inseminaciones. El resto fueron sometidos al paso por el citómetro de flujo, experimentando así todos los pasos necesarios para la realización de la técnica conocida como "Beltsville Sperm Sorting Technology" y desarrollada por Johnson y cols. en 1989, para posibilitar la separación de los espermatozoides X e Y. Los espermatozoides diluidos fueron teñidos con el fluorocromo Hoechst 33342 ( $0.3 \mu\text{M} / 1 \times 10^6$  espermatozoides) e incubados en oscuridad durante 1h a  $35^\circ\text{C}$ . Tras la incubación las muestras teñidas fueron filtradas a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de  $30 \mu\text{m}$ , para evitar la presencia de espermatozoides

aglutinados u otras partículas de mayor tamaño durante el análisis. Los espermatozoides fueron separados utilizando un citómetro modelo EPICS Altra modificado para la separación espermática a alta velocidad (Beckman Coulter Corporation, Miami, FL, USA), trabajando a una presión de 3.655 Kg/cm<sup>2</sup> y equipado con un láser de argón emitiendo en el espectro ultravioleta (351-364 nm) y con una potencia de 175 mW (Coherent Lasers, Inc., Santa Clara, CA, USA). Los espermatozoides sometidos al paso por el citómetro fueron recogidos en tubos de plástico de 50 ml, conteniendo 5 ml del medio de recogida "TEST-yolk" (218 mmol TES, 56.1 mmol TRIS, 33.2 mmol glucosa y % v/v de yema de huevo fresca) descrito por Johnson y cols. (1989), suplementado con un 10% de plasma seminal de verraco. Los espermatozoides recogidos fueron conservados a 22°C hasta el momento de su utilización. Previamente a la realización de las inseminaciones, se procedió a la concentración de los mismos mediante centrifugación a 500g durante 4 min. La concentración final fue ajustada a 150 millones de espermatozoides en 7.5 ml. Solo las muestras que presentaron mas de un 65% de espermatozoides motiles y un mínimo de un 70 % de acrosomas intactos, tras la separación, fueron utilizados en las inseminaciones.

### 2.3. Inseminación Artificial

Las inseminaciones fueron llevadas a cabo utilizando el procedimiento de inseminación intrauterina profunda (DUI) desarrollado por Martínez y cols. (2002), permitiendo la deposición de los espermatozoides en el tercio distal del cuerno uterino.

Teniendo en cuenta que los espermatozoides separados pueden presentar una reducción en su capacidad fecundante debido al efecto del proceso de separación sobre sus membranas (Maxwell y cols., 1998; Maxwell y Johnson, 1999), se controló el momento de la ovulación en las cerdas que iban a ser inseminadas median-

te DUI. Para ello, se sometieron las hembras a un tratamiento de sincronización y control de la ovulación, mediante la administración de 1250 UI de eCG (gonadotropina corionica equina. Folligon, Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands) 24 horas tras el destete, seguida 72 horas después por la administración de 750 UI de hCG (gonadotropina corionica humana. Chorulon, Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands).

La DUI se realizó 38 horas después de la administración de la hCG en las jaulas de gestación sin necesidad de sedación de las cerdas. Una vez limpia el área perineal de la hembra se insertó en el cérvix un catéter comercial de IA (Minitüb Tiefenbach, Alemania) a través del cual se introdujo el catéter flexible para la inseminación profunda (1'80 m de longitud; diámetro externo de 4 mm, canal de trabajo de 1'80 mm). El catéter de IA sirvió para facilitar la manipulación del catéter flexible que fue introducido a través del cérvix a lo largo del cuello uterino hasta alcanzar el tercio anterior de un cuerno uterino. El canal de trabajo del catéter flexible se lavo con BTS a 22°C antes de la inseminación. Las dosis de inseminación se depositaron en uno de los cuernos uterinos utilizando una jeringuilla desechable de 10 ml unida al canal de trabajo del catéter flexible. Tras la deposición de los espermatozoides se introdujeron 2 ml adicionales de BTS en el canal de trabajo del catéter flexible, con el fin de forzar la salida de los espermatozoides que podrían haber quedado en el interior del mismo.

### 2.4. Evaluación de los parámetros reproductivos

Los diagnósticos de gestación se realizaron a los 24-28 días tras la DUI, repitiéndose 15 días más tarde, mediante ecografía transabdominal. A todos los animales gestantes se les permitió terminar la gestación, registrándose tanto la tasa de partos como el tamaño de camada.

## 2.5. Evaluación de la normalidad de la descendencia

### 2.5.1. Evaluación Fenotípica

Para el estudio de este parámetro se valoró, en cada una de las camadas obtenidas, el número de lechones nacidos 1) vivos, 2) muertos, 3) momificados, 4) débiles y 5) morfológicamente anormales. Todos los lechones nacidos vivos fueron pesados dentro de las 2 h posteriores al nacimiento, así como en el momento del destete (21 días tras el nacimiento) y posteriormente a los 42 y 92 días.

### 2.5.2. Evaluación Citogenética

El intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) y las aberraciones cromosómicas estructurales (ACs) han sido usadas como biomarcadores para la evaluación de un posible daño en el ADN de los animales nacidos, para lo cual fue necesario la realización de cultivos *in vitro* de sangre procedente de estos lechones.

La sangre se obtuvo de lechones de entre 3 y 4 meses de edad (con un peso aproximado de 40-50 Kg) de forma aséptica. Los cultivos *in vitro* se realizaron según el protocolo descrito previamente por Parrilla y cols. (2004) para linfocitos de porcino. Así, 0'5 ml de sangre entera con aproximadamente  $6 \times 10^6$  de linfocitos fueron añadidas a las placas de cultivo *in vitro* las cuales contenían, 8 ml de medio RPMI 1640 sin L-glutamina (Gibco Life Technologies, Barcelona), incluyendo 1 ml de suero fetal bovino, 0'1 ml de L-glutamina (Gibco), 50 µl de solución de antibióticos y antimicóticos (antibiotic/antimicotic solution®, A5955), y 0'1 ml Pokeweed mitogeno (Lectina procedente de *Phytolacca Americana*) con el fin de estimular la actividad mitótica de las células cultivadas. Los cultivos se incubaron durante 68 h a 38'5°C. A las 24 h del inicio de la incubación se añadió 0'1 µg/ml de bromodeoxiuridina (BrdU) a cada una de las placas de cultivo. Esta concentración de BrdU

fue la dosis optima encontrada en un estudio preliminar destinado a determinar una concentración de esta sustancia suficiente para permitir la diferenciación de los ICHs, pero teniendo un efecto mínimo sobre la frecuencias básales de estos intercambios (Parrilla y cols., 2004). Se realizo un cultivo control sin BrdU para determinar los niveles basales de ACs.

Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad durante un tiempo adicional de 20 a 22 h a 38,5°C hasta completar las 68 h totales. Quince minutos antes del sacrificio de los cultivos se añadió, a cada uno de ellos 0,1 µg/ml de colcemida (Colcemid.Gibco) un inhibidor de la mitosis. Para el sacrificio de los cultivos se centrifugaron las células a 370 g durante 10 minutos. Seguidamente se elimino el sobrenadante y se sometió el sedimento a un choque hipotónico con una solución de 75 mM de KCl durante 20 minutos. Se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones descritas anteriormente, eliminándose el sobrenadante y fijando el sedimento resultante con la solución de Carnoy (metanol y acido acético en una proporción 3:1 (v/v)). Tras la fijación, las células se distribuyeron homogéneamente sobre la superficie de los portaobjetos, los cuales se dejaron secar al aire protegidos de la luz. Una vez secos, se procedió a la tinción de las preparaciones con naranja de acridina (0,1% en tampón fosfato, pH=7) durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se lavaron los portaobjetos con abundante agua. Por último, se añadió una gota de tampón Sörensen a cada portaobjetos, se les colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes. Las preparaciones se guardaron en la oscuridad hasta el momento de su visualización. Las muestras se evaluaron con un microscopio de fluorescencia (Leica DMRB Fluo; Heerbrugg, Switzerland). Los datos referentes a los ICHs y a las ACs se obtuvieron a partir de 50 metafases elegidas al azar pertenecientes al segundo ciclo de replicación celular, las cuales presentaban los 38 cromosomas característicos del cariotipo del ganado porcino claramente visibles. Se

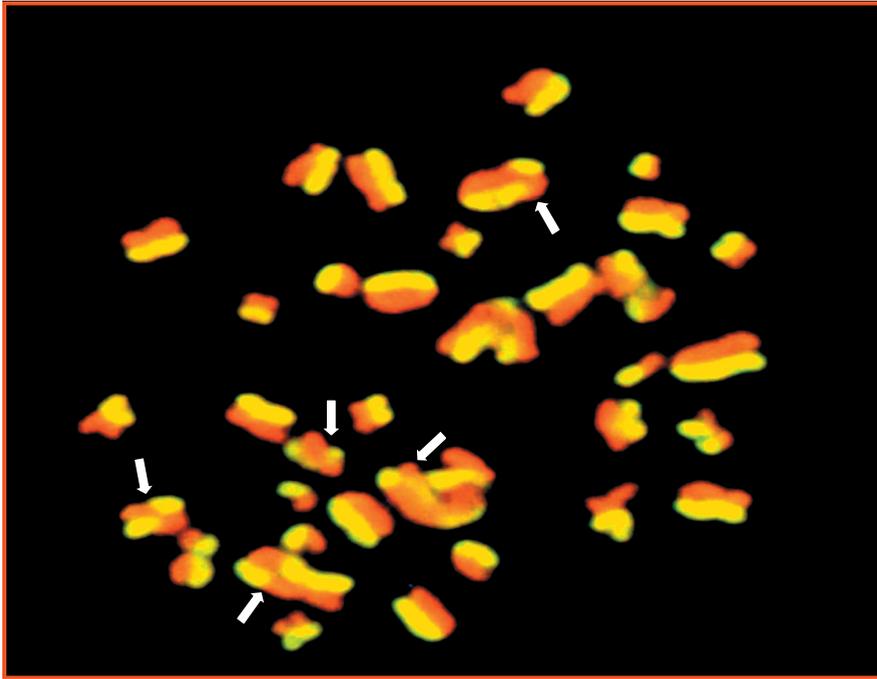


Figura 1: Placa metafásica obtenida tras el cultivo, en presencia de bromodeoxiuridina, de linfocitos de lechones nacidos tras las inseminaciones realizadas con espermatozoides separados. Las flechas indican el lugar de intercambio entre cromátidas hermanas de un mismo cromosoma.

contabilizó un ICHs cada vez que dentro de una misma cromátida se visualizó un cambio en la coloración de la misma (Figura 1). De igual manera, las ACs se registraron cuando se observó una discontinuidad, mayor de la anchura de una cromátida, en una o ambas cromátidas dentro de un mismo cromosoma.

## 2.6. Diseño Experimental

El diseño experimental se basó en un modelo factorial 2x2, utilizándose para la realización del mismo cerdas obtenidas a partir de espermatozoides separados y no separados las cuales fueron, a su vez, inseminadas con espermatozoides sometidos al proceso de separación por citometría de flujo, así como con espermatozoides diluidos.

Se evaluaron los parámetros reproductivos de las DUI realizadas con espermatozoides separados (s) y diluidos (c; control), en cerdas de primera generación obtenidas tras la utilización de espermatozoides sometidos al proceso de separación (cerdas S), y en cerdas también de primera generación nacidas a partir de espermatozoides no procesados (cerdas C), determinando cuatro grupos de inseminación: Ss, Sc, Cs y Cc. Se realizó también un análisis fenotípico y genotípico de la descendencia obtenida tras estas inseminaciones (segunda generación). Se utilizaron un total de 62 cerdas pertenecientes al grupo S (30 Ss y 32 Sc) y de 53 pertenecientes al grupo C (28 Cs y 25 Cc). La evaluación de los parámetros reproductivos, así como los relativos a la normalidad fenotípica de la descendencia, se obtuvieron a partir de todas las cerdas inseminadas y de

**Tabla 1. Tasas de gestación, tasas de partos y tamaños de camadas obtenidos en las cerdas de los diferentes grupos experimentales inseminadas con  $150 \times 10^6$  espermatozoides separados o diluidos (control). Los valores para el tamaño de camada se expresan como media  $\pm$  S.E.M.**

Grupo Experimental	Nº cerdas inseminadas	Tasa de Gestación (%)	Tasa de partos (%)	Tamaño de Camada
Ss	30	43'3 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>	8'6 $\pm$ 1
Sc	32	81'2 <sup>b</sup>	81'2 <sup>b</sup>	9'5 $\pm$ 1'4
Cs	25	44 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	8'8 $\pm$ 1'5
Cc	28	85.7 <sup>b</sup>	82.1 <sup>b</sup>	9'3 $\pm$ 1'6

Valores con diferentes superíndice dentro de una misma columna, indican diferencias significativa ( $P < 0,05$ ).

**Ss:** Cerdas de la primera generación nacidas tras inseminación con espermatozoides separados e inseminadas con espermatozoides separados; **Sc:** Cerdas de la primera generación nacidas tras inseminación con espermatozoides separados e inseminadas con espermatozoides diluidos (control); **Cs:** Cerdas de la primera generación nacidas tras inseminación con espermatozoides diluidos e inseminadas con espermatozoides separados; **Cc:** Cerdas de la primera generación nacidas tras inseminación con espermatozoides diluidos e inseminadas con espermatozoides diluidos (control)

todos los lechones nacidos, respectivamente. Los análisis citogenéticos se realizaron sobre dieciséis animales, 2 machos y 2 hembras de cada uno de los grupos, elegidos al azar.

### 2.7. Análisis Estadístico

Los datos se expresan como porcentajes o medias  $\pm$  S.E.M, considerando que existen diferencias significativas con valores de  $P < 0,05$ . El porcentaje de cerdas gestantes y que llegaron a parto en cada uno de los grupos se comparó usando el test de Chi-cuadrado. Las diferencias respecto al tamaño de camada, al número de lechones vivos y muertos, de lechones débiles, de animales con anormalidades morfológicas, de momificados, así como al número de ICHs y ACs fueron analizadas con un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5/PC (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3. RESULTADOS

Los datos que se muestran a continuación corresponden a 5 semanas consecutivas. Los parámetros reproductivos obtenidos tras la rea-

lización de las inseminaciones se muestran en la Tabla 1. Las tasas de gestación y de partos más bajas ( $P < 0'05$ ) correspondieron a las cerdas inseminadas con espermatozoides separados. Sin embargo, no se observaron diferencias ( $P > 0'05$ ) en los tamaños de camada, en cada uno de los grupos de inseminación. Así mismo tampoco se observaron diferencias ( $P < 0'05$ ) entre grupos para las diferentes características fenotípicas evaluadas.

El peso medio de los lechones nacidos en cada uno de los grupos al nacimiento quedó establecido en  $1'48 \pm 0'03$  Kg,  $1'35 \pm 0'03$  Kg,  $1'40 \pm 0'04$  Kg y  $1'32 \pm 0'04$  Kg para los lechones nacidos en los grupos Ss, Sc, Cs y Cc, respectivamente. El peso medio al destete (21 días tras nacimiento) no varió ( $P > 0,05$ ) entre grupos siendo de  $5'45 \pm 0'5$  Kg,  $5'20 \pm 0'3$  Kg,  $5'15 \pm 0'3$  Kg, y  $5'34 \pm 0'4$  Kg para los grupos Ss, Sc, Cs y Cc, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron para los pesos a los 42 y 92 días del nacimiento, alcanzándose, a los 42 días, valores próximos a los 11Kg en todos los grupos, mientras que a los 92 días el peso de los lechones, en todos los casos, fue cercano a los 50 Kg.

Los resultados correspondientes al análisis citogenético de los animales evaluados se mues-

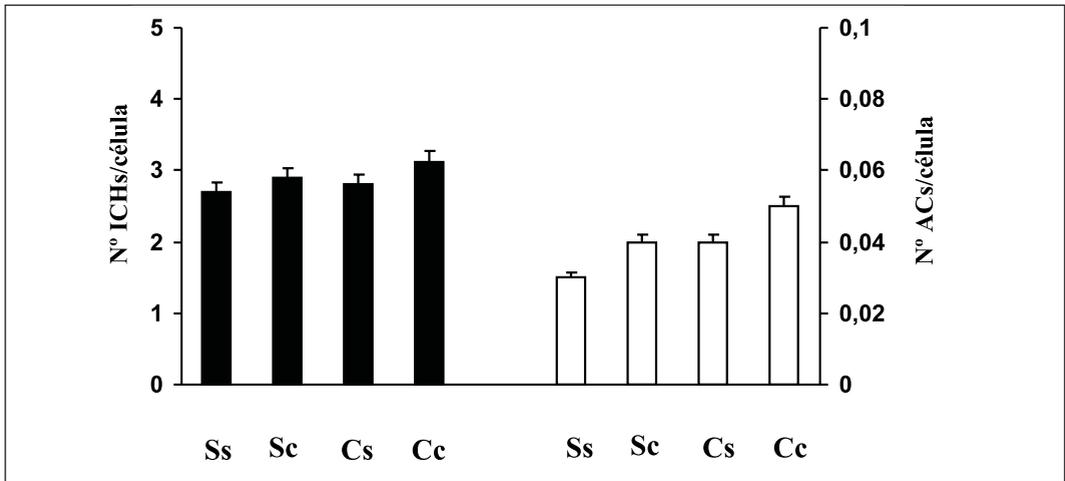


Figura 2: Medias  $\pm$  S.E.M. de las frecuencias de ICHs y CAs por célula en linfocitos de lechones nacidos tras DUI en cada uno de los grupos de inseminación evaluados. Ss: Lechones nacidos de cerdas de la primera generación obtenidas tras inseminación con espermatozoides separados e inseminadas con espermatozoides separados. Sc: Lechones nacidos de cerdas de la primera generación obtenidas tras inseminación con espermatozoides separados e inseminadas con espermatozoides diluidos (control); Cs: Lechones nacidos de cerdas de la primera generación obtenidas tras inseminación con espermatozoides diluidos e inseminadas con espermatozoides separados; Cc: Lechones nacidos de cerdas de la primera generación obtenidas tras inseminación con espermatozoides diluidos e inseminadas con espermatozoides diluidos (control).

tran en la figura 2. El valor de promedio de ICHs por célula no varió ( $P > 0.05$ ) entre los lechones nacidos tras las inseminaciones realizadas en cada uno de los grupos de cerdas siendo de  $2.7 \pm 0.3$ ,  $2.89 \pm 0.2$ ,  $2.80 \pm 0.1$  y  $3.12 \pm 0.2$  para los grupos Ss, Sc, Cs y Cc, respectivamente. Las aberraciones cromosómicas (ACs) observadas fueron principalmente de tipo cromatídico afectando, en la mayoría de los casos, únicamente a una de las dos cromátidas de un mismo cromosoma. El porcentaje de metafases con CAs fue muy bajo situándose en  $0.04 \pm 0.01$ ,  $0.03 \pm 0.01$ ,  $0.04 \pm 0.01$ ,  $0.05 \pm 0.01$  CAs/célula para los lechones obtenidos en los grupos Ss, Sc, Cs y Cc, respectivamente ( $P > 0.05$ ).

#### 4. DISCUSIÓN

La tinción del ADN de los espermatozoides con el fluorocromo Hoechst 33342 y el im-

pacto del láser ultravioleta sobre estas células son dos etapas fundamentales en la separación espermática mediante citometría de flujo. Teniendo en cuenta que estos agentes podrían alterar la integridad del ADN (Ashwood-Smith, 1994), la demostración objetiva de la seguridad genética de la técnica y su inocuidad sobre la progenie resulta imprescindible ya que la normalidad fenotípica de todos los animales obtenidos a partir de espermatozoides separados por citometría de flujo (Seidel y Garner, 2002) ha sido el método habitual para demostrar la seguridad genética de este procedimiento de separación.

En un estudio previo realizado en porcino (Parrilla y cols., 2004), hemos demostrado que ni el fluorocromo Hoechst 33342 utilizado en la tinción de los espermatozoides, ni la combinación de éste con el impacto del láser tienen un efecto perjudicial sobre el ADN espermático

que pudiera traducirse en un aumento del número de lechones con anomalías morfológicas en la descendencia de la primera generación. Sin embargo, y teniendo en cuenta que los animales obtenidos a partir de espermatozoides seleccionados en función del cromosoma X o Y serán utilizados principalmente como reproductores, resulta básico conocer si su capacidad reproductiva se ve afectada, así como determinar la normalidad fenotípica y genotípica de su descendencia.

La utilización de espermatozoides separados en las inseminaciones provocó una disminución significativa tanto de la tasa de gestación como de la tasa de partos y en aquellas cerdas inseminadas con espermatozoides sometidos al proceso de separación por citometría de flujo (Ss y Cs), a diferencia de las inseminadas con espermatozoides control, independientemente de si las cerdas habían nacido de espermatozoides separados o no. Estos resultados eran esperados y coincidentes con los que habíamos obtenido previamente (Vazquez et al., 2003). Este descenso en la tasa de gestación, observado también en otras especies (Johnson y cols., 1989; Johnson, 1991,1995; Cran y cols., 1993; Seidel y cols., 1999; Hollinshead y cols., 2002 a y b; Seidel y Garner, 2002; Maxwell y cols., 2003), podría ser atribuido a varios factores. En primer lugar, este descenso podría ser debido a la reducción de la capacidad fecundante de los espermatozoides que impida la fecundación de los ovocitos. Este hipótesis está fundamentada en resultados obtenidos previamente donde demostrábamos cómo la capacidad fecundante de los espermatozoides separados disminuye, especialmente cuando los tiempos de conservación superan las dos horas (Parrilla y cols, 2005). Sin embargo, alteraciones embrionarias podrían ser también las responsables de una inhibición del desarrollo embrionario y un fracaso en la gestación. En este sentido, se ha demostrado en conejas, cerdas, vacas y yeguas (Johnson y cols., 1989; Johnson, 1991; Seidel y cols., 1997; Buchanan y cols., 2000) una reducción en la

supervivencia de los embriones obtenidos con espermatozoides separados, la cual podría ser explicada sobre la base del trabajo publicado por Ahmadi y Ng (1999), en el que se asegura que aunque los espermatozoides que presentan lesiones en el ADN son capaces de fecundar los ovocitos con la misma efectividad que los no dañados, el desarrollo embrionario es significativamente mas bajo cuando se utilizan espermatozoides con el ADN alterado. Sin embargo, investigaciones más recientes llevadas a cabo en cigotos de bovino y porcino demuestran que cuando se utilizan espermatozoides teñidos y separados empleando los nuevos citómetros de alta velocidad, el desarrollo embrionario y la capacidad de esos embriones para alcanzar el estadio de blastocisto no se ven afectados (Guthrie y cols., 2002; Zhang y cols., 2003). Esta posibilidad de que la pérdida embrionaria se deba a un daño en el ADN de los espermatozoides separados hace necesario profundizar en el conocimiento de la inocuidad del procedimiento de separación. El análisis citogenético de la descendencia obtenida tras las inseminaciones con espermatozoides separados representa una herramienta de gran utilidad para la evaluación del posible efecto perjudicial del proceso de separación espermática por citometría de flujo sobre la progenie. El intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) y las aberraciones cromosómicas (ACs) han sido y siguen siendo en la actualidad utilizados, de forma generalizada, como análisis citogenéticos indicadores de la exposición a agentes perjudiciales para el ADN, lo que determino su utilización en este estudio. La evaluación de los ICHs es considerada como una prueba citogenética mas sensible que las ACs para la evaluación del potencial efecto toxico sobre el ADN de una gran variedad de agentes mutagénicos y carcinogénicos (WHO, 1993). Sin embargo la realización de un sólo tipo de análisis citogenético no se acepta de forma general como evidencia suficiente para clasificar una determinada sustancia como mutagénica (WHO, 1985). Por tanto y teniendo en

cuenta que ambas pruebas no son excluyentes entre sí, sino que resultan complementarias y pueden responder con diferente sensibilidad al agente sospechoso fueron incluidas en la realización de esta experiencia.

El número de ICHs y ACs por célula obtenido en metafases linfocitarias de los lechones nacidos tras las inseminaciones realizadas con espermatozoides separados, tanto en hembras obtenidas con espermatozoides separados (Ss) como en aquellas obtenidas a partir de espermatozoides diluidos (Cs), demostraron que no existían diferencias significativas respecto a los encontrados en linfocitos pertenecientes a los animales obtenidos a partir de espermatozoides no teñidos. Estos resultados sugieren que la combinación del Hoechst 33342 con el impacto del láser durante el proceso de separación resulta inocua para la descendencia, cuando este método de separación se aplica en dos generaciones sucesivas. Estos resultados podían resultar previsible, en primer lugar, debido a los resultados obtenidos anteriormente (Parrilla y cols., 2004) para la primera generación de animales tras la inseminación con espermatozoides separados por citometría de flujo y, en segundo lugar porque el Hoechst 33342 ha sido definido como un fluorocromo específico de ADN que se une, sin intercalarse, a los pares de bases adenina-timina presentes en el surco menor de la doble hélice de ADN (Johnson y Schulman, 1994). Además, debe ser tenido en cuenta que actualmente y gracias a la alta velocidad, la duración del tiempo de exposición de los espermatozoides al láser es mucho más reducida que cuando se utilizaban equipos de separación de velocidad estándar, y por tanto cualquier posible efecto perjudicial que pudiera producirse en el ADN de los espermatozoides debido al impacto del láser ultravioleta debería ser mucho menor (Guthrie y cols., 2002). Por último, la elevada condensación de la cromatina espermática, en comparación con otros tipos celulares, determina que el ADN de los espermatozoides sea

altamente resistente frente a agentes físicos o químicos (Lopes y cols., 1998), lo cual podría representar una óptima protección tanto frente al Hoechst 33342 como frente al impacto del láser ultravioleta.

Por lo tanto y a modo de resumen, podría ser argumentado que el único efecto perjudicial observado en el uso de espermatozoides separados por citometría de flujo es el descenso en los índices de fertilidad, descenso que debe estar más relacionado con la reducción de la capacidad fecundante de los mismos que con una alteración del ADN espermático. Esta alteración de la funcionalidad espermática sin alteración del material genético determinaría una disminución en los parámetros reproductivos sin que esto llevara consigo un incremento en el número de gestaciones perdidas, en la incidencia de abortos o en la presencia de anomalías morfológicas en la descendencia, coincidiendo con lo observado en esta experiencia. La normalidad fenotípica y citogenética de los lechones nacidos en el presente estudio permiten afirmar que la combinación del Hoechst 33342 con el impacto del láser no produce alteraciones relevantes en el ADN de los espermatozoides de verraco separados, al menos con las técnicas de evaluación utilizadas.

## AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Isabel Burguete y Dino Di Berardino por su excelente ayuda con las técnicas citogenéticas. Al Grupo de Investigación Reproducción Animal de la Universidad de Murcia, donde este trabajo ha sido desarrollado. Esta investigación ha sido financiada por la Fundación Séneca (BPS 00201/CV/02; PB/74/FS/02), Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2001-0471) y el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (03-180; 03-402) y han sido realizadas en los laboratorios del Grupo de Investigación Reproducción Animal de la Universidad de Murcia y en la empresa Dalland Hybrid España S.A.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadi A and NG Soon-Chye. 1999. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 284: 696-704.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Haggmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shoker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International programme on chemical safety. *Mutat Res* 463: 111-172.
- Ashwood-Smith MJ. 1994. Safety of human sperm selection by flow cytometry. *Hum. Reprod.* 9: 757.
- Buchanan BR, Seidel GE Jr, McCue PM, Schenk JL, Herickhoff LA, Squires EL. 2000. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology* 53: 1333-44.
- Bustos-Obregon E, Goicochea RI. 2002. Pesticide soil contamination mainly affects earworm male reproductive parameters. *Asian J. Androl.* 4: 195-9.
- Carrano AV, Minkler JL, Stetka DG, Moore DH. 1980. Variation in the baseline sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Environ Mutagen* 2:325-337.
- Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D, Polge C. 1993. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilisation. *Vet. Rec.* 132: 40-41
- Johnson LA, Aalbers JG, Grooten HJG. 1988. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), modified modena (MM) or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection *Zuchthygiene* 23: 49-55.
- Guthrie HD, Johnson LA, Garrett WM, Welch GR, Dobrinsky JR. 2002. Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 87-92.
- Hollinshead FK, O'Brien JK, Maxwell WM, Evans G. 2002 a. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 14: 503-508.
- Hollinshead FK, Rath D, O'Brien JK, Maxwell WMC, Evans G. 2002 b. Effect of time of insemination and dose of sorted cryopreserved ram sperm on fertility on ewes. *Repro. Fertil. Dev.*: 14: 53 (abstract 22).
- Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X- and Y- sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41: 199-203.
- Johnson LA. 1991. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- or Y- bearing sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 26: 309-314.
- Johnson LA, Schulman JD. 1994. The safety of sperm selection by flow cytometry. *Hum. Reprod.* 9: 758-759.
- Johnson LA. 1995. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*: 7: 893-903.
- Johnson LA. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 93-107.
- Johnson, L.A.; Rath, D.; Vázquez, J.M.; Maxwell, W.M.C.; Dobrinsky, J.R. 2005. Pre-selection of sex in swine for production of offspring: an update on the process and application. *Theriogenology* 63: 615-624.
- Latt SA, Allen J, Bloom SE, Carrano A, Falke E, Kram D, Schneider E, Schreck R, Tice R, Whitefield B and S Wolff. 1981. Sister chromatid exchanges: A report of the Gene-Tox program. *Mutat. Res.* 87: 17-62.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG Casper RF. 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13: 896-900.

- Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, BN Day. 2002. Minimal number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction* 123:163-70.
- Maxwell WM, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR and Welch GR. 1998. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 433-440.
- Maxwell WMC, Johnson LA. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*: 52: 1353-62.
- Maxwell WMC, Hollinshead FK, Rath D, O'Brien JK, Evans G. 2003. Effect of dose of sperm processed for sex-sorting and cryopreservation on fertility in ewes. *Theriogenology*: 52: 511 (abstract).
- Munné S. 1994. Flow cytometry separation of X and Y spermatozoa could be detrimental for human embryos. *Hum. Reprod.*: 9: 758.
- Parrilla I, Vazquez JM, Cuello C, Gil MA, Roca J, Di Berardino D, Martinez EA. 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow sorted boar spermatozoa. *Reproduction*: 128: 615-621.
- Parrilla, I. Vázquez, J.M. Gil, M.A. Caballero, I. Almiñana, C. Roca, J. Martinez, E.A. .2005. Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* (doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.11.004).
- Perry P and Evans HJ. 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchanges. *Nature* 258: 121-125.
- Seidel GE Jr, Allen CH, Johnson LA, Holland MD, Brink Z, Welch GR, Graham JK, Cattell MB. 1997. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of non frozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology* 48: 1255-64.
- Seidel GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, Cran DG. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52: 1407-1420.
- Seidel GE, Garner DL. 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*: 124: 733-743.
- Valentine R, Himmelstein MW. 2001. Overview of the acute, subchronic, reproductive, developmental and genetic toxicology of beta-chloroprene. *Chem Biol Interact.* 2001: 1:135-136:81-100. Review.
- Vazquez JM, Martinez EA, Martinez P, Garcia-Artiga C, Roca J. 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47: 913-922
- Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Parrilla, I.; Roca, J.; Gil, M.A.; Vázquez, J.L.2003. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1605-1614.
- WHO. 1985. IPCS Environmental Health Criteria 51: Guide to short-term test for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals Geneva, World Health Organization
- WHO. 1993. IPCS Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and Risk Assessment: Concept and Principles Geneva, World Health Organization
- Zhang M, Lu KH and Seidel GE Jr. 2003. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology* 60: 1657-1663.

