

75656

RAMIREZ CASTEX, HERNAN

Utilización de mano - obra en la agricultura para exportación y de y su comercio.

2016 75656



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN EQUINA

**UTILIZACIÓN DE NANO-PARTÍCULAS MAGNÉTICAS
PARA SEPARAR ESPERMATOZOIDES X DE Y EN
SEMEN EQUINO**

TESIS

TESISTA

Hernán Ramírez Castex, MV Dipl.

*Centro de Medicina Reproductiva Equina Bioteq
Huelquén, Paine, Chile*

DIRECTOR

Luis Losinno, MV, PhD

*Director Laboratorio de Reproducción Equina, Departamento de Producción
Equina. Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, Río Cuarto, Argentina.*

Río Cuarto – Argentina

Noviembre de 2016



320.5

<small>FORM NO. 1</small>
Credit:
T. 1077

75656

JURADO DE TESIS

Miragaya, Marcelo Horacio, MV, MSc, PhD

Profesor Titular Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Aguilar Valenciano, José Javier; MV, MSc, PhD

Profesor Adjunto de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Neild, Deborah; MV PhD

Profesora Adjunta, exclusiva, Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

AGRADECIMIENTOS

No existe un orden establecido para agradecer a las personas que estuvieron directa e indirectamente apoyando esta etapa en mi vida. Pero la familia está siempre primero y por lo mismo agradezco a Carla, Elena y Hernán por aguantar mis ausencias más aun cuando mis dos hijos vinieron al mundo durante el transcurso de esta Maestría.

Gracias a mis padres y hermanos por el apoyo, interés y presencia permanente con mis estudios a pesar de ya ser un hombre grande y destetado. Siguen siendo padres de primera y preocupados hasta de los detalles más pequeños de mis viajes.

Gracias Luis por seguir siendo mi principal Gurú en esta vocación que nos une a tantos. Tu forma de ver y decir las cosas, tu carácter y personalidad así como tu energía y visión de vida han perpetuado en mi muchas cosas que me sirven día a día para tratar de ser mejor en esta profesión.

Gracias a todas las personas que sientan ser parte de este logro. No necesito nombrarlos pues cada uno sabe que ha aportado en este camino. Pero sí dejo una mención especial para mis compañeros de Maestría a quienes estimo mucho y hemos creado una familia nueva que será difícil de disolver. Gracias Salvajes!

Para mi Padre quien me ha heredado y entregado el amor por aprender y enseñar siendo humilde y honesto. Esta tesis es fruto tuyo y ejemplo de tu fortaleza e integridad en tiempos difíciles a través de tu hijo quien te admira y quiere sin precedentes.

Índice

I. INTRODUCCION	11
II. HIPÓTESIS	26
III. OBJETIVOS	27
IV. MATERIALES Y MÉTODO	28
Diseño experimental esquemático	28
V. RESULTADOS	33
VI. DISCUSION	38
VII. CONCLUSIONES	42
ANEXOS	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

Índice de tablas y figuras

Tabla N°1: Valores de viabilidad espermática (VE) determinados por tinción de eosina-nigrosina y test hiposmótico (HOST)	33
Grafico N°1: Distribución de los datos de viabilidad espermática (VE) del estudio para tiempo cero (T0), grupo control y grupo sexado con NP determinado por tinción vital de eosina nigrosina (ANOVA)	34
Grafico N°2: Distribución de los datos de viabilidad espermática (VE) del estudio para grupo control y grupo sexado con NP determinado por tinción vital de eosina nigrosina (test de student)	34
Grafico N°3: Distribución de los datos de viabilidad espermática (VE) del estudio para tiempo cero (T0), grupo control y grupo sexado con NP determinado por test hiposmótico (HOST) (ANOVA)	35
Grafico N°4: “ Distribución de los datos de viabilidad espermática (VE) del estudio para grupo control y grupo sexado con NP determinado por Test hiposmótico (HOS)” (test de student)	35
Grafico N°5: Distribución de los datos de concentración espermática del estudio para tiempo cero (T0), grupo control y grupo sexado con NP. (ANOVA)	36
Tabla N°2: Proporciones de espermatozoides X determinados por la prueba de FISH.	36
Fotografía N°1: Suspensión de Nano-partículas Magnéticas, Clemente Associates®	43
Fotografía N°2: Fluido Tubárico Humano, Irvine Scientific®	43
Fotografía N°3: Adición de Nano-Partículas a la suspensión de HTF y espermatozoides.	43

Fotografía N°4 y N°5: Separación o colección de espermatozoides Y hacia él magneto.....	43
Fotografía N°6: Zonas de nano-partículas y espermatozoides "Y" adheridas a la pared del tubo posterior a la colección con el magneto.	44
Fotografías N°7 y N°8: Espermatozoides X exhibiendo cromatina con tinción XCP GREEN (Xcyting chromosome paint).....	44
Fotografías N°9 y N°10: Espermatozoides X al microscopio con-focal con contraste DAPI.	44

RESUMEN

La preselección de sexo antes de la concepción ha sido uno de los objetivos perseguidos por científicos y criadores. En la industria de la leche y carne bovina existen razones objetivas y productivas para calcular el beneficio económico de desear un sexo ó el otro, sin embargo, en equinos el deseo de un sexo u otro, es más subjetivo y sujeto a otras variables.

La única forma reproducible y eficiente hasta hoy de separar espermatozoides que contienen el cromosoma X de los que contienen el cromosoma Y basado en el contenido de Ácido desoxiribonucleico (ADN) desde una muestra de semen es por medio del uso de la citometría de alto flujo desarrollada por Johnson en 1986. (Samper *et. al*, 2012)

Sin embargo, sólo ha sido utilizada a nivel comercial y a gran escala en bovinos. El número de espermatozoides que pueden ser eficazmente seleccionados por hora en el citómetro de flujo ha sido una limitante para su aplicación masiva especialmente en especies que requieren de un alto número de espermatozoides para inseminar una hembra cómo es el equino (Panarace *et. al*, 2014). Además se deben considerar las susceptibilidades de estos gametos a los variados procesos que ocurren durante el sexado por citometría de flujo (Garner, 2006)

Por otro lado la aplicación en condiciones de campo de semen congelado y sexado requiere de mayor investigación para producir muestras de semen de mejor calidad que las que existen en el presente para hacerlo comercialmente sustentable. (Clulow *et. al* 2009)

El presente estudio tuvo como objetivo principal el ensayar una nueva técnica de separación de espermatozoides que contienen uno u otro cromosoma sexual, considerando tres pilares fundamentales: 1) probar una técnica más rápida que la citometría de flujo actual, 2) obtener dosis de semen de mayor número de espermatozoides disponibles y 3) que la viabilidad del eyaculado original previo al proceso no sufriera detrimento al nivel que las técnicas actuales producen.

Se utilizaron 5 padrillos de distintas razas y entre 7 y 12 años de edad con fertilidad comprobada. Previo al estudio todos fueron colectados una vez al día por 7 días para realizar una depleción de sus reservas extra-gonadales y ponerlos en DSO (daily sperm output) o eyaculación diaria de espermatozoides estabilizada. Posteriormente durante el estudio los padrillos fueron colectados 2 veces por semana hasta completar 6 eyaculados totales por padrillo. Cada eyaculado fue separado en dos fracciones: grupo control (sin exposición a nano-partículas) y grupo experimental (procesado con nano-partículas para obtención de espermatozoides con cromosoma X). En cada grupo se evaluó viabilidad espermática con tinción de eosina nigrosina y test hiposmótico (HOST) a tiempo

cero (T0) y nuevamente terminado el proceso de sexado. Así también se calculó la concentración post sexado para el grupo en estudio y a través de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se determinó con microscopia confocal la proporción de espermatozoides con cromosoma X en cada muestra sexada.

Además como prueba biológica se inseminaron 4 yeguas con 250 millones de espermatozoides frescos sexados y utilizando la técnica intracornual profunda.

Los resultados del estudio determinaron que la viabilidad espermática no se ve afectada sino que además aumenta entre T0 y post sexado con nano-partículas ($p < 0,0001$) y la tasa promedio de espermatozoides X recuperados en los 30 eyaculados sexados fue de 91,5% según los resultados de FISH. Además se preñaron las 4 yeguas inseminadas lo cual demuestra la fertilidad potencial del semen sexado y que al determinar el sexo fetal con ultrasonido a los 125 días de gestación fueron hembras en todos los casos (100%).

Palabras claves: sexado, cromosoma, espermatozoide, nano-partículas.

ABSTRACT

Gender selection before conception has been a goal of scientists and breeders. Depending on the species in question, there will be different reasons for performing this procedure. In dairy and beef cattle industries exists objective and productive reasons to predict the economic value of desiring one or the other gender. However, in horses, the difference between deciding a desired or non desired gender is a much more subjective issue.

The only reproducible and efficient way of separating X- and Y-bearing sperm based on the desoxy-ribonucleic acid (DNA) content from an ejaculate or a semen sample is by the use of high-speed flow cytometry developed by Johnson in 1986 (Samper et. al, 2012)

However, it is only in the bovine species where offspring of the desired sex are obtained commercially in a great scale level. The number of sperms that can be effectively sex-sorted per hour with a flow sorter has been a limitation for the application and widespread use of this technology in species such as the horse, that require large number of sperms to inseminate the female (Panarace et.al, 2014). In addition, successful sperm sexing must take into account the relative susceptibilities of gametes to the different processes that occur during cytometry sorting (Garner, 2006).

Furthermore, the use of thawed and sorted semen in the field requires further investigation before this technology produces better quality semen samples than to date and becomes commercially sustainable in the equine industry (Clulow et. al, 2008).

The main objective of this study was to test a new technology for sorting equine sperm bearing X and Y chromosomes considering three main topics: 1) to try a faster technology than high flow cytometry, 2) obtain higher numbers of sperm for insemination doses and 3) with ejaculate viability not suffering the detriment that the current techniques provoke.

Five stallions of different breeds, between 7 and 12 years old and with proven fertility were used in this study. Before the trial all stallions were collected once a day for 7 days to deplete extragonadal reserves and establish DSO (daily sperm output) conditions. During the trial the stallions were collected twice a week until they completed 6 ejaculates. Each ejaculate was divided into two fractions: control group (without nano-particle exposure) and Sex-sorted group (with nano-particle exposure for chromosome X bearing sperm collection). For each group, viability was determined using eosin nigrosine stain and hypoosmotic swelling test (HOST) at time zero (T0) and again after sex-sorting. Concentration was determined for the sex-sorted group after the process. Fluorescent in situ hybridization (FISH) was used to establish the proportion of X-bearing sperm in the sex-sorted sample.

A total of 4 mares were inseminated with a total of 250 million fresh sex-sorted sperm using the deep-horn insemination technique. At 125 days of gestation, trans-rectally guided ultrasound was used to determine the sex of each of the four fetuses.

Results showed that viability was not compromised and even increased in all 30 ejaculates for the sex-sorted group when compared to T0 ($p < 0.0001$). The average percentage of X-bearing sperm obtained was 91.5% determined by F.I.S.H. In addition, all 4 mares

inseminated with fresh sorted semen got pregnant, thus determining the potential fertilizing capacity of the sex-sorted ejaculates and the establishment of female gestations in all the cases tested (100%) as determined by fetal gonad observation using ultrasound at 125 days of gestation.

Key words: sex, chromosome, sperm, nano-particles.

I. INTRODUCCION

La determinación del sexo en humanos y animales es un objetivo que ha sido de interés desde la época de la antigua Grecia. Hipotéticamente tanto el espermatozoide X e Y tienen la misma probabilidad de fertilizar un ovocito lo que resulta en una proporción teórica de 1:1 al momento de la concepción. La manipulación artificial de la tasa o proporción de sexos en la progenie es útil en algunos casos, en especial productivos, en programas de mejoramiento genético, promover el bienestar animal y para prevenir la eliminación del sexo no deseado. Las preferencias por un determinado sexo son por motivos comerciales, afectivos u otras razones específicas de cada caso. Actualmente la herramienta más utilizada para manipular la proporción de sexos en la progenie ha sido el uso de semen sexado (Machado *et. al*, 2015).

La manipulación de la tasa de sexo de la progenie ha sido estudiada y observada por varios años. Por ejemplo la hipótesis de Trivers-Willard propone que un sexo tiene mayor éxito variable reproductivo (ejemplo: machos en especies polígamas), madres en buena condición corporal estarán en ventaja para producir más de ese sexo, mientras que madres en pobres condiciones estarán en ventaja en producir reproductivamente sexos más estables (Trivers y Willard, 1973). En concordancia con esta hipótesis, se sostiene que en especies mamíferas, la esperada tasa de sexo de la progenie de 1:1, es influenciada por las condiciones ambientales presentes al momento de concepción (Machado *et. al*, 2015).

Se postula que el ambiente externo es de alguna forma señalado al concepto por la madre vía el ambiente uterino (Aiken y Ozanne, 2013). El estado nutricional de la madre parece ser de suma importancia para la transmisión de esta señal. En varias especies los embriones macho tienen mejor oportunidad de sobrevivir sobre los embriones hembra en un ambiente uterino enriquecido, por ejemplo bajo condiciones de altas concentraciones de glucosa (Avery *et. al*, 1992; Gutiérrez Adán *et. al*, 2001; Cameron, 2004).

En forma similar existen reportes que en los caballos de Camargue (Francia) la tasa de sexo de los potrillos fue liderada por hembras en años donde la temporada anterior hubo baja disponibilidad de alimento. Sin embargo, no es del todo claro si esta predisposición a hembra resultaba por influencias sobre la concepción ó diferencias en las pérdidas tempranas de gestación, entre embriones hembras y machos (Monard *et. al*, 1997). Estos resultados fueron apoyados por investigaciones en caballos en Nueva Zelandia (Kaimanawa, asilvestrados). En este estudio, las yeguas que parían hembras estaban en peor condición corporal al momento de la concepción que aquellas que producían machos (Cameron *et. al*, 1999). Dado que las tasas de parición no tuvieron diferencia entre hembras de baja ó buena condición corporal al momento de la concepción y la

condición de la yegua a mediados de la gestación y en gestación tardía no influyen sobre la tasa de sexo de la progenie puede concluirse que las desviaciones en la tasa de sexo de potrillos nacidos de yeguas con diferente condición corporal al momento de la concepción no son producto de pérdida embrionaria ó fetal. Por lo tanto, la variación en la tasa de sexo de la progenie es probablemente influenciada muy cerca de la concepción (Cameron *et. al*, 1999). Cuando la información de este estudio fue re-evaluada y el cambio en la condición corporal alrededor del momento de la concepción y no la condición *per se* fue analizada, las influencias sobre la tasa de sexo fueron aún más pronunciadas. En las yeguas que perdían condición corporal al momento de la concepción, los porcentajes de progenie macho se redujo a 3 por ciento, mientras que aumentaba a 80 por ciento cuándo las yeguas estaban ganando peso al momento de la concepción (Cameron y Linklater, 2007)

Todos estos resultados entregaron gran soporte a la hipótesis de Trivers-Willard en el caballo. Es más, también se demostró que los cambios en condición corporal al momento de la concepción son más predictivos del sexo fetal que la condición corporal *per se* (Cameron y Linklater, 2007).

En conclusión, se sugiere que manipular las condiciones ambientales de las yeguas al momento de la concepción ó durante la gestación temprana influye la oportunidad de los embriones de uno u otro sexo de sobrevivir y puede variar la tasa de sexo de la progenie. Por lo tanto, es importante notar que esta condición también puede ocurrir *in vitro* considerando los ambientes en que los embriones son expuestos en programas de transferencia embrionaria, criopreservación y otras biotecnologías reproductivas de mayor complejidad como la Fertilización in vitro (FIV) o la Inyección intra-citoplasmática de espermatozoide (ICSI) (Machado *et. al*, 2015).

Con respecto al tiempo de servicio o inseminación en relación a la ovulación, por muchos años se ha creído que esta condición influye en las tasas de sexo de la progenie. Esta relación se cree que son influencias del tracto reproductivo de la hembra sobre el transporte de los espermatozoides X o Y, selección preferencial al momento de la fertilización ó pérdidas embrionarias sexo específicas. Existen numerosas publicaciones en este tópico con resultados disímiles. En ganado bovino parece tener muy baja influencia (Rorie, 1999). En caballos, no existen estudios controlados al respecto, pero la experiencia empírica e historia no soportan esta hipótesis (Samper *et. al*, 2012).

Recientemente un grupo de investigadores de Brasil publicó que la edad de los padres y la diferencia de edad entre estos al momento de la concepción también tienen influencia sobre la tasa de sexo de la progenie al parto. En resumen se observó tras analizar miles de registros de nacimiento de la Asociación Brasileña de Criadores de raza Mangalarga que a medida que aumenta la edad de los padres la proporción de disminuye produciendo

do mayor número de hembras y menor número de machos nacidos. El efecto a diferencia que en humanos, se vio con más influencia en la hembra (yegua) que el efecto del macho (padrillo). Algo similar se observó para la diferencia de edad entre ambos donde a mayor diferencia de edad también se producen más hembras en especial si la yegua es mayor que el padrillo (Machado *et. al*, 2015).

Por otra parte se ha realizado la determinación temprana del sexo en embriones equinos a través de la detección del antígeno sexo específico macho H-Y, utilizando anticuerpos fluorescentes. En embriones equinos este método resulta en una eficacia del 82%, comparado con los resultados obtenidos utilizando cariotipo (Wood, 1988). Es importante notar que este método no es muy efectivo en embriones que han iniciado la formación del blastocelo y aumentan los falsos negativos (Ramalho *et. al*, 2004). Dado que los embriones equinos entran al útero como mórula tardía ó blastocisto temprano, sólo una pequeña proporción de embriones recuperados podrían ser procesados por este método. La recuperación de embriones a menor estadio de desarrollo utilizando métodos no invasivos es a la fecha imposible en el caballo (Battut, *et. al* 1997; Checure, *et. al* 2016)

La detección de secuencias sexo específicas de ADN ha sido otra herramienta empleada para determinar el sexo. La determinación del sexo en embriones bovinos antes de su transferencia es rutinaria y exitosa utilizando la amplificación del ADN a través de la reacción de polimerasa en cadena (PCR) (Aasen y Medrano, 1990). Sin embargo, los embriones equinos son mucho más sensibles a la biopsia celular comparado con otras especies, ya que el desarrollo exitoso a nivel uterino depende de una cápsula acelular intacta (Stout *et al.*, 2005). Esta cápsula se desarrolla entre el trofoblasto y la zona pelúcida y rodea al embrión hasta aproximadamente el día 21 de gestación (Flood *et al.*, 1982). Sin embargo, recientemente han sido reportadas transferencias exitosas de embriones equinos biopsiados (Choi *et al.*, 2010). La viabilidad embrionaria se mantuvo tanto en embriones de día 6 donde la cápsula no se había desarrollado por completo y también en embriones de día 7 y 8 con cápsulas completas. Seguramente se sugiere que el daño producido en la cápsula es muy pequeño y por lo tanto no afecta la habilidad del embrión para desarrollarse en el útero ó este fue reparado (Walter *et al.*, 2010).

Actualmente, la PCR utilizada para determinar el sexo embrionario trabaja con genes específicos localizados en el cromosoma Y. En el estudio de Choi en 2010 la determinación del sexo fue lograda exitosamente utilizando Duplex PCR en el gen específico de macho SRY. En este estudio la amplificación por PCR fue posible en 20 de 24 muestras. Nueve de las gestaciones logradas fueron permitidas a seguir su curso y llegar a término. En todas ellas, la determinación del sexo embrionario previo a la transferencia fue confirmada en un 100%. La técnica requiere equipo sofisticado así como personal capacitado, por lo tanto, no es aplicable en condiciones de campo ó regiones donde es requerida esporádicamente. Sin embargo, el transporte de los embriones por la noche,

previo a la biopsia celular no influyó en las tasas de gestación, lo que sugiere que dicho procedimiento puede ser ofrecido por laboratorios especializados de ubicación central (Alonso *et al.*, 2015).

La detección de ARN sexo-específico es otra técnica disponible. Las células somáticas de la hembra están conformadas por dos cromosomas X y por lo tanto, teóricamente producen el doble de transcritos X específicos que las células del macho (Epstein, 1978). Para evitar la sobreexpresión, un cromosoma X es inactivado. La inactivación requiere de un ARN específico llamado transcritos X específicos inactivados (Xist) (Rastan, 1994). En 1987 basándose en el conocimiento de la inactivación del cromosoma X, se efectuó una prueba de determinación de sexo en embriones equinos. La determinación del sexo fue posible en un 77% de los embriones (Romagnano *et al.*, 1987). Esta técnica requiere de la fijación del embrión y por lo tanto no es aplicable para sexar embriones con el objetivo de producir prole. Recientemente, se ha publicado la determinación del ARN Xist con el fin de determinar el sexo de embriones equinos hembra (Beckelmann *et al.*, 2012). Se obtuvo un error del 10% con PCR cualitativo y un error menor con PCR cuantitativo. Xist puede ser un candidato interesante para determinar el sexo en caballos utilizando sondas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

De todos modos, la técnica más utilizada en la actualidad es la determinación del sexo fetal en útero. La identificación y ubicación ultrasonográfica del tubérculo genital en el caballo es la primera opción. En el día 55 de la gestación el tubérculo genital está ubicado entre ambos miembros posteriores del feto, a una distancia aproximadamente idéntica entre el cordón umbilical y la cola. Posteriormente el tubérculo migra hacia la cola en la hembra y hacia el cordón umbilical en el macho, lo que permite la determinación del sexo fetal. El momento óptimo para la determinación del sexo fetal es entre el día 59 y el día 68 de gestación. Las tasas de éxito de la técnica son muy variables y dependen principalmente de la experiencia del examinador (Curran y Ginther 1991; Bucca, 2005; Martínez *et al.*, 2016).

La segunda opción ultrasonográfica es la identificación de las gónadas en el feto. A partir del día 100 de gestación, la combinación de la ultrasonografía transabdominal y transrectal permiten el examen visual del feto por completo, con una identificación real de los órganos sexuales primarios completamente desarrollados. Entre el día 100 y 220 de gestación la efectividad de esta técnica es muy alta (Bucca, 2005). Pero a medida que transcurre la gestación es cada vez más difícil identificar estructuras anatómicas asociadas, como pene y prepucio en el macho ó glándula mamaria en la hembra (Renaudin *et al.*, 1999).

Durante la gestación es posible efectuar el análisis del sexo fetal a través de la colecta de células de placenta ó fluidos fetales. Hasta ahora no existe el reporte del uso de esta



técnica en la yegua. En bovinos esta técnica fue utilizada en 1975 por Bongso y Basrur. La determinación del sexo fue efectuada por análisis de cromosomas. La técnica mejoró con la introducción de la PCR. La técnica es poco practicable y limitada, ya que la colecta de fluido fetal es un desafío. Se han reportado abortos durante la primera semana posterior a la punción y colecta de líquido amniótico.

Avanzada la gestación se puede realizar el análisis del sexo fetal desde material fetal colectado de la circulación materna. Es un nuevo método prometedor para la determinación del sexo fetal en el caballo ya que consiste en la identificación de ADN fetal libre circulante en sangre materna (De León *et al.*, 2012). La técnica es fácil y de bajo riesgo ya que sólo implica coleccionar una muestra de sangre de la madre. La ausencia de secuencias de cromosoma Y en plasma materno implica que el feto es hembra, sin embargo, esto también podría significar que es la consecuencia de no detectar ADN fetal libre en presencia de un feto macho. La significancia de esta técnica sería poder implementarla en estadíos tempranos de gestación. En el presente no se sabe si células fetales del cinturón coriónico entran a circulación materna al momento de la invasión del endometrio, evento que ocurre al día 37 de gestación (Allen *et al.*, 1975). La identificación de células fetales de macho en sangre materna, puede ser posible a través de la clasificación celular activada mediante fluorescencia ó la clasificación celular a través de inmuno-magnetismo, ambos métodos más utilizados para separación celular no invasiva en el diagnóstico prenatal en humanos (Kavanagh *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha estudiado si células fetales se mantienen en circulación materna más allá del parto, por lo tanto, en gestaciones futuras esto limitaría la técnica de detección de células fetales de macho en sangre materna en yeguas que no han experimentado una gestación de un concepto macho.

Por lo tanto, y como conclusión, a pesar que existen varias posibilidades para determinar el sexo de un concepto en el caballo, la mayoría de éstas demandan equipos de alto costo, experiencia y entrenamiento. O por otro lado son posibles de realizar a etapas de la gestación muy avanzada donde muchas veces no se puede tomar una decisión a tiempo para descartar un sexo no deseado o no es posible de realizar bajo condiciones de campo.

Además con respecto al espermatozoide se han buscado diferencias en tamaño, peso, densidad, velocidad de propulsión, cargas eléctricas de superficie, proteínas de superficie, diferencias de efecto de pH ó los efectos de la presión atmosférica usando sedimentación de espermatozoides, electroforesis, filtración por Sephadex, migración por gradientes de centrifugación, diferencias en cargas eléctricas, unión a perlas inmunomediadas y reacción de polimerasa en cadena (PCR), con el fin de separar espermatozoides X de Y. A pesar de que muchos de estos procedimientos no han podido rigurosamente confirmar este desafío científico, existen muchas patentes aclamando alteraciones en la separación de sexos (Garner *et al.*, 2001 y 2006).

Garner publicó un método repetible que puede determinar en forma precisa la diferencia en contenido de ADN entre el espermatozoide X e Y de diferentes especies. En la mayoría de las especies domésticas la diferencia en ADN entre ambos espermatozoides es de entre 2% y 4 %, siendo la del padrillo alrededor de 3,4% a 3,7%.

La mayoría de los mamíferos machos producen espermatozoides con cabezas ovas y planas, que pueden ser orientadas en un clasificador utilizando fuerzas hidrodinámicas. La medición del contenido de ADN ha sido utilizada para identificar cromosomas sexuales en poblaciones espermáticas de al menos 23 especies mamíferas y se han obtenido progenies completamente normales de al menos siete de éstas. El gameto macho maduro es una célula pequeña y haploide que puede ser eficazmente analizada en su contenido de ADN ya que éste atributo es estable entre espermatozoides sanos. En los comienzos de la citometría de flujo, el proceso dañaba severamente a los espermatozoides, debido a la remoción agresiva de la cola y de las membranas que rodean al núcleo, previo a la tinción con 4-6-diamidina-2-fenilindon (DAPI). No fue hasta la aparición de la tinción Hoechst 33342 y su utilización, que se logró determinar ADN en espermatozoides vivos. Esta medición precisa del contenido de ADN y su diferencia entre el cromosoma X e Y en espermatozoides mamíferos, ha entregado una forma efectiva de separar gametos viables con una efectividad entre 85 y 95%. La citometría de flujo para clasificar espermatozoides X e Y está patentada y se han entregado licencias para su utilización en mamíferos no humanos (Garner *et al.*, 2001 y 2006).

Un atributo importante que varía entre los espermatozoides de los mamíferos es la forma de la cabeza. La mayoría de los mamíferos domésticos tienen cabezas ovaladas y planas, con la excepción de roedores y monotrematas. La efectividad de utilizar las diferencias de contenido de ADN entre espermatozoides que contienen el cromosoma X y el cromosoma Y dependen no sólo en diferencias relativas de ADN, sino que también en la habilidad de orientar en forma precisa a estos gametos al momento de la medición en el citómetro de flujo. Los espermatozoides mamíferos con cabezas ovaladas y planas, tienden a estar más preparados para orientarse en un citómetro utilizando hidrodinámica que esos gametos que tienen cabezas más redondas ó angulares. En este contexto, se sugiere que el espermatozoide más fácil de separar en un citómetro de flujo, es el del toro, dado su perfil de cabeza y su diferencia en contenido de ADN de 3,8% entre X e Y. Por lo tanto no es sorprendente que los mayores éxitos en esta técnica han sido logrados en semen bovino (Garner *et al.*, 2001 y 2006).

En adición al desarrollo de medios óptimos para ser utilizados en espermatozoides de cada especie, es necesario también modificar la boquilla del citómetro de flujo que orienta a cada espermatozoide de cada especie. A pesar que la clasificación en el citómetro de flujo resulta en la eliminación de espermatozoides muertos y dañados, las células vivas y clasificadas que sobreviven al proceso, tienden a degenerar más rápido que las

gametas no procesadas utilizadas como grupo control en toros y verracos. Esta característica no se ha observado en padrillos y carneros (Sharpe y Evans, 2009).

Es así como el único método probado y repetible de preselección de sexo de espermatozoides está basado en la tecnología de citometría de flujo, adaptada por primera vez para espermatozoides por GledHill en 1976. En 1986 Johnson y Pinkel hicieron modificaciones importantes a esta tecnología para orientar a los espermatozoides hacia el láser, lo que mejoró la separación de los espermatozoides. La tinción vital del ADN espermático llevó a la producción de la primera progenie viable con preselección de sexo por Johnson el año 1989 en conejos. Posteriormente, desde el año 1991 hasta 2005 se ha logrado en ovinos, bovinos, equinos, humanos y varias otras silvestres (Garner *et al.*, 2001 y 2006).

Rens mejoró este sistema al desarrollar una nueva punta que mejora la orientación de los espermatozoides duplicando la proporción de espermatozoides vivos para análisis. En términos generales, después de este proceso se obtienen tres poblaciones de espermatozoides: X, Y y una tercera población de espermatozoides mal alineados y/o muertos. Una vez que los espermatozoides han sido clasificados la muestra es reanalizada para confirmar la pureza de la población de espermatozoides deseada (Garner *et al.*, 2001 y 2006).

La primera etapa en la separación de espermatozoides involucra la dilución a concentraciones específicas que permitirán un teñido homogéneo con el fluorocromo Hoechst 33342. La cantidad de H33342 requerido es cuidadosamente titulada para cada padrillo para proveer una cantidad precisa de tinción por espermatozoide. Posteriormente, los espermatozoides son incubados con la tinción para que ésta penetre las membranas espermáticas y se una a las regiones de ADN ricas en Timina y Adenosina. Como la concentración óptima de H33342 varía entre padrillos, se debe tener precaución porque niveles altos presentarían toxicidad, que es exhibida con reducción de la motilidad espermática (Johnson y Welch, 1999).

Posterior a la tinción e incubación de los espermatozoides con H33342, la muestra es diluida aún más para la separación con tecnología de activación fluorescente de células (FACS). La habilidad de separar espermatozoides X de Y con estas tecnologías FACS, depende de los tamaños relativos de los cromosomas X e Y y del contenido total de ADN espermático (Johnson y Welch, 1999).

En este punto, una nueva tinción es añadida la que es captada por los espermatozoides no viables con membrana plasmática degenerada. Esta tinción (tinción para alimentos) satura la intensidad de la fluorescencia de los espermatozoides no viables y por lo tanto permite la clasificación preferencial de las poblaciones de espermatozoides viables.

Cualquier reducción en la proporción de espermatozoides no viables en la muestra a sexar, mejorará las tasas de flujo y clasificación durante el proceso (Johnson y Welch, 1999).

Aunque estos éxitos demostraron la capacidad fertilizante de espermatozoides separados por procedimientos de separación de células por medio de activación fluorescente (FACS), estos procesos continúan generando preguntas y nuevos desafíos en muchas especies. La tecnología FACS es excitante, pero al presente es únicamente semi-práctica. En equinos muchos de estos desafíos se centran en la posibilidad de obtener buenas tasas de gestación con semen sexado congelado. Técnica que, de funcionar, lo haría útil del punto de vista práctico y por ende capaz de ser ofrecida comercialmente (Morris, 2005).

La viabilidad total de una población espermática y la integridad de sus membranas plasmáticas influyen en la efectividad del proceso de tinción, en la orientación de los espermatozoides y en las tasas de clasificación o separación. Por lo tanto, las tasas de separación y de viabilidad post sexado son mejoradas en poblaciones homogéneas de espermatozoides morfológicamente normales. La habilidad para maximizar las tasas de separación de espermatozoides equinos está limitada por la relativa pobre y heterogénea calidad espermática comparada a la de carneros y toros en programas de reproducción comercial. Esta heterogenicidad de las poblaciones espermáticas equinas podría ser disminuida si sólo se procesaran muestras que satisfagan un mínimo de tasa de motilidad progresiva y de espermatozoides morfológicamente normales (carneros mayor a 80%, toros mayor a 75%) siendo la tasa de espermatozoides morfológicamente normales de padrillos fértiles alrededor de 60%. Otra forma de reducir la heterogeneidad de la muestra es utilizando lavados a través de gradientes de densidad previo al sexado. A pesar de estas cualidades pobres, comparadas con otras especies, aún así es posible de separar espermatozoides X de Y en forma adecuada (70 a 90% en equinos) (Clulow *et al.*, 2009).

Una vez que se completa el proceso de sexado, la muestra es nuevamente centrifugada y re-suspendida. Esta es la segunda y última centrifugación durante el proceso, previo a la inseminación ó crío-preservación de la muestra. En muchas especies el semen sexado es evaluado mediante pruebas de fertilidad *in vitro* antes de iniciar pruebas de inseminación a gran escala, cosa que en equinos la FIV no es factible (Clulow *et al.*, 2009).

Los principales factores que afectan las tasas de gestación con semen sexado son los bajos números de espermatozoides disponibles para inseminación y además el proceso de crío-preservación de estos espermatozoides sexados. El factor del bajo número de espermatozoides disponibles ha sido medianamente compensado por el desarrollo de la inseminación histeroscópica y la intracornual profunda a bajas dosis (Samper *et al.*, 2012).

Así como en bovinos, existe una variación significativa entre padrillos con respecto a la posibilidad de separación de una muestra de semen. Clulow, usando el Moflo SX, reportó que aunque algunos padrillos son excelentes candidatos para la separación de espermatozoides, otros no lo son. En sus experimentos la tasa de espermatozoides muertos fue un buen predictor de la capacidad de sexaje de algunos padrillos. Para reducir la proporción de espermatozoides muertos, procesar la muestra de semen con Equipure® o Androcoll® (coloides selectivos) puede reducir significativamente la variabilidad entre padrillos. Aun más, la eficiencia de clasificación en el proceso de análisis para algunos padrillos puede ser mejorada hasta un 40% (Samper *et al.*, 2012).

En la citometría de flujo, el requerimiento de que la identificación de cada espermatozoide sea singular limita el número de éstos clasificados por segundo. Aunque el número de espermatozoides analizados por hora ha aumentado significativamente desde uno a dos millones a principio de los años 90, a los actuales 70 a 80 millones por hora, el proceso aún es ineficiente en la producción de dosis estándar para inseminación artificial (Clulow *et al.*, 2009).

Aunque muchas mejoras se han ido implementado con los años para aumentar las tasas de clasificación de espermatozoides y su calidad, aún menos del 50% del total de espermatozoides analizados son clasificados correctamente, con un 25% aproximado de espermatozoides X y 15 a 20% de espermatozoides Y. Consecuentemente el uso de semen sexado requiere de técnicas de inseminación artificial intracornual profunda a bajas dosis (Clulow *et al.*, 2009).

Las tasas de gestación con semen fresco sexado tienen rangos entre 10 y 40%, cuando se ha utilizado entre 5 y 25 millones de espermatozoides vía inseminación profunda. La baja dosis y la alta dilución de la dosis inseminantes tienen por lo general efectos adversos en las tasas de gestación (Clulow *et al.*, 2009). En concordancia con el estudio de Jasko este reportó una reducción en la fertilidad cuando el semen sexado era diluido a concentraciones menores a 5 millones/ml (Jasko, 1992). Morris, Hunter y Allen reportaron tasas de fertilidad aceptables utilizando un millón de espermatozoides suspendidos en 100 a 250 microlitros de diluyente junto con inseminación histeroscópica (Morris *et al.*, 2000). En los últimos años, distintos trabajos independientes de Morris, Samper y Lascombes, inseminando entre 13 y 40 millones de espermatozoides y utilizando 15 padrillos diferentes, han resultado en tasas de gestación entre 40 y 60% usando inseminación profunda (Aurich *et al.*, 2014).

Desafortunadamente la fertilidad del semen sexado congelado no ha producido resultados satisfactorios. Las tasas de gestación publicadas fluctúan entre 0 y 16,6% utilizando dosis de inseminación entre 5 y 20 millones de espermatozoides. Aunque la motilidad, viabilidad y morfología espermática del semen congelado sexado son similares al con-

gelado no sexado, los resultados en tasas de gestación son muy diferentes. Algunas de las explicaciones incluyen los efectos mecánicos de la intensidad del láser, la alta presión y alto voltaje, altas fuerzas de centrifugación y dentro de los efectos químicos ó bioquímicos se puede mencionar la producción de radicales de oxígeno por la prolongada incubación con la tinción H33342, daño a la cromatina espermática, cambios de pH, alteraciones a proteínas de superficie y crio-daño (Aurich *et al.*, 2014).

Dentro de los esfuerzos para mejorar la eficiencia y la calidad del semen después de haber sido sexado, está el uso de soluciones de amortiguación y coloides de centrifugación. Se han ensayado diferentes curvas de congelación para semen sexado. Lo ideal sería desarrollar un protocolo estándar para el procesamiento de semen con fluidos que minimicen los cambios severos tipo iónicos y de pH. Una vez que los protocolos estén estandarizados se podrían conducir estudios de fertilidad. Para tener un impacto en la industria, la muestra de semen de un padrillo debe tener la capacidad de ser transportado a un laboratorio que lo procese para sexaje y posteriormente lo envíe de vuelta al lugar de residencia de la yegua a ser inseminada. Este impacto en la industria no puede ser logrado hasta que el efecto de sexar el semen sobre la función de la membrana y la integridad del ADN espermático sea determinada para así diseñar protocolos apropiados de preservación (Aurich *et al.*, 2014).

La predicción de la capacidad de sexado del semen de un padrillo es importante del punto de vista de la aplicación comercial de la tecnología en la industria equina. Aunque una tasa de sexado lenta logra mejor clasificación y separación de espermatozoides X e Y, logrando una mayor pureza de la muestra, la eficiencia del proceso es afectada negativamente. Más aún, a mayor tiempo de procesado, menor calidad espermática de la muestra. El sexado por citometría de flujo es tiempo dependiente porque las células son clasificadas a tasas de entre 3000 y 5000 células por segundo. Estas tasas resultan en un tiempo de proceso de 1,5 horas para clasificar solamente 16 millones de células para inseminación o crio-preservación (Clulow *et al.*, 2009).

La pregunta que muchas veces nace es si existe o no una demanda comercial real. Como ejemplo, en una encuesta de 2010, Graaf reportó que entre 2500 propietarios de yeguas frisonas de la asociación real sólo el 66,3% mostró interés en el sexado de semen. El 34,7% no interesado, indicó como razones el encontrarlo no ético ó que simplemente no deseaban preseleccionar el sexo de la progenie. En cambio de la tasa de interesados sobre el 60% elegirían hembras. Otras asociaciones de raza donde aparentemente existe un interés por la demanda de un sexo específico son los criadores de caballos de polo y de caballos para movimiento a la rienda y de ganado (Samper *et. al.*, 2012).

En los caballos de polo existe una mayor demanda por hembras (Panarace *et. al.*, 2014),

mientras que en caballos de carrera ó de rienda se prefieren machos. En los remates de caballos de carrera se pagan mayores precios por machos que por hembras (Chezum y Wimmer, 1997). En la competencia internacional de Aachen en Alemania sólo el 24.1% de los caballos que han llegado a la final entre 1928 y 2010 fueron hembras. En el oeste de Estados Unidos las hembras son preferidas como caballos de silla para ganado mientras que los machos son preferidos para caballos de rienda. En la raza Cuarto de Milla de carrera los precios que se pagan por las hembras al año de edad, exceden con creces los precios de los machos (Samper *et. al*, 2012).

Sin importar la raza, la selección de un sexo determinado es subjetiva y está determinada por impresiones de individuos que tienen una yegua ó un padrillo específico. Algunos creen que las potranca de un padrillo en particular son mejores, mientras otros piensan lo contrario. Sin embargo, un nicho de mercado para el semen sexado podría ser la de los reemplazos maternos. Otro, el producir un macho de una yegua específica como prospecto de padrillo. Mientras otros quisieran una hembra de un padrillo específico para un prospecto de yegua madre (Samper *et. al*, 2012).

Hasta ahora la determinación del sexo en caballos, es principalmente efectuada a través de ultrasonografía fetal a los dos meses de gestación (Curran y Ginther 1991; Renaudin, 1999). La interrupción de la gestación en yeguas receptoras que llevan dentro de ellas fetos de un sexo no deseado (principalmente machos) es cada vez más común en Argentina (Aguilar *et. al* 2015). Por lo tanto, métodos que puedan seleccionar el sexo deseado ó determinarlo a temprana edad gestacional son cada vez más elegidos. La introducción de la determinación genética de sexo en programas de transferencia embrionaria es sin dudas una de las aplicaciones más prometedoras hoy en día para el equino (Aurich *et. al*, 2014).

Un área de la medicina y la tecnología que recientemente ha explorado en la infertilidad masculina es la nano-tecnología y/o nano-medicina. Esta se refiere a la tecnología que trata o utiliza partículas sintetizadas a la escala de nanómetros o nano-escala (1 a 100 nm). Estas nano-partículas pueden ser fabricadas en diferentes tamaños y composiciones y su bio-compatibilidad con fluidos biológicos las convierten en un excelente dispositivo o herramienta para interacciones con células marcadas y no marcadas para propósitos que utilicen fluorescencia o magnetismo (Feugang *et. al*, 2015).

Los eyaculados de distintas especies de machos contienen poblaciones espermáticas heterogéneas. Esta heterogenicidad puede producir problemas de infertilidad en el macho. Recientes estudios en nanotecnología en sistemas fisiológicos han demostrado tener aplicaciones en biología reproductiva. Es así como existen las técnicas de nano purificación espermática utilizando estas nano-partículas (NP) con procesos asociados de magnetismo, fluorescencia, inmuno-mediados o con marcadores de superficie de

membrana logrando separar espermatozoides vivos de muertos y apoptóticos y así mejorar la infertilidad del semen en cuestión (Feugang *et. al*, 2015).

Con fines de marcación celular, las lectinas y los sistemas de receptores de carbohidratos ubicados en la membrana plasmática de espermatozoides sirven como candidatos para ser marcadores. Las lectinas son glicoproteínas capaces de producir aglutinación espermática a través de su mecanismo de unión a carbohidratos de membrana. Las lectinas son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. Su principal papel está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular. Por ejemplo, algunas bacterias utilizan lectinas para acoplarse a las células del organismo hospedador durante la infección.

No se deben confundir con las glicoproteínas ya que las lectinas reconocen carbohidratos, mientras que las glicoproteínas están formadas en parte por ellos. Tampoco deben confundirse con las lecitinas que son moléculas de lípidos con la que no guardan ninguna relación.

Numerosos estudios han utilizado lectinas exógenas para investigar la dinámica de estos carbohidratos en espermatozoides normales, capacitados y reaccionados de acrosoma de machos fértiles y sub-fértiles. Un reciente estudio utilizó nano-partículas magnéticas cubiertas de lectinas con el fin de remover espermatozoides anormales de semen de toro. Los resultados fueron un aumento de las tasas de gestación después de inseminación artificial (Feugang *et. al*, 2015).

También existen estudios en verracos para remover espermatozoides anormales con los mismos fines que en toros. También se han estudiado las tasas de gestación, efectos sobre las hembras inseminadas y el desarrollo post natal en la progenie nacida en vacas y marranas inseminadas con semen procesado con esta tecnología (Feugang *et. al*, 2015).

La apoptosis es un proceso fisiológico de importancia crítica en el sistema reproductivo del macho, ya que controla entre muchas otras cosas, la sobreproducción de espermatozoides, por lo tanto asiste en la capacidad de mantención y soporte de las células de Sertoli. La apoptosis procede en dos fases principales. Primero existe una fase de compromiso, a la que le sigue una fase de ejecución. Estas fases están caracterizadas por una serie de cambios estereotípicos que incluyen achicamiento celular, disrupción de la membrana plasmática, externalización de Fosfatidilserina (PS) y condensación y fragmentación de cromatina. Sin embargo, apoptosis desregulada ha sido implicada en la patogénesis de la infertilidad en el macho y por lo tanto puede ser responsable en las fallas de las técnicas de reproducción asistida, a pesar de usar espermatozoides móviles y morfológicamente normales. La falla en la eliminación de espermatozoides

apoptóticos durante la espermatogénesis (apoptosis abortiva) puede ser la razón de su presencia en semen (Makker *et al.*, 2008 ; Curti *et al.*, 2014).

En la actualidad el análisis de semen convencional incluye evaluación de la concentración, movilidad, morfología y viabilidad. Sin embargo, no provee ninguna información sobre la apoptosis, la cual como descrito anteriormente puede jugar un rol importante en las bajas tasas de fertilización e implantación observadas en las técnicas de reproducción asistida. Numerosas técnicas de preparación de espermatozoides han sido utilizadas para maximizar los resultados en las técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas utilizan espermatozoides móviles como referencia los cuáles se supone que tienen la capacidad de fertilizar un ovocito. Las técnicas actuales de preparación de espermatozoides están basadas en sedimentación ó migración y separan espermatozoides basado en su motilidad y densidad. (Said *et. al*, 2006; Makker *et. al*, 2008;).

La tecnología de separación magnética de células (Magnetic Activated Cell sorting - MACS) es una técnica para la preparación de espermatozoides usada recientemente en técnicas de reproducción asistida. Esta tecnología, ha mostrado que puede separar espermatozoides móviles, viables y morfológicamente normales que despliegan una tolerancia significativa a la crio-preservación y tienen un mejor potencial de fertilización. Permite la separación de espermatozoides apoptóticos, incluso en machos con parámetros espermáticos normales. Los principios de la técnica MACS utiliza micro-partículas súper paramagnéticas conjugadas con Anexina de 50 nanómetros para separar espermatozoides no apoptóticos de aquellos con membranas plasmáticas deterioradas y con externalización de PS. En los espermatozoides normales y viables con membrana plasmática intacta, las PS, molécula cargada negativamente, está ubicada en la porción interna de la membrana plasmática, por lo tanto lo que ocurre en estos casos, es una traslocación de PS, desde la porción interna de la membrana hacia la superficie externa. Esta externalización de PS, es una de las características más tempranas de las células apoptóticas (Said *et al.*, 2006; Makker *et al.*, 2008).

Las micro-partículas están compuestas por matriz biodegradable y por lo tanto, no es necesario removerlas del espermatozoide después del proceso de separación además, no alteran la estructura, función ó actividad de los espermatozoides. La anexina-V, tiene afinidad de unión con la PS. Esta anexina-V no tiene la habilidad de traspasar una membrana intacta, por lo tanto, la anexina unida a un espermatozoide caracterizaría una disrupción en la integridad de la membrana de este. Por lo tanto, esta afinidad de anexina de identificar células con alteración de integridad de membrana, ocurre en una etapa más temprana que si se usaran tinciones supravitales. Basado en la unión de anexina y la subsecuente separación magnética, se obtienen dos fracciones: anexina negativa (membrana intacta y no apoptótica) y anexina positiva (membrana alterada y apoptótica) (Makker *et al.*, 2008).

Dentro de las ventajas de MACS es que esta tecnología actúa a nivel molecular del espermatozoide, en oposición a las técnicas de rutina de preparación de éstos que requieren o se basan solamente en la densidad y motilidad espermática. Ha sido utilizada para optimizar las características de criopreservación y descongelación y mejorar las tasas de crio-supervivencia. Ha mejorado la tasa de espermatozoides con mitocondrias intactas posteriores a la criopreservación. Al separar los espermatozoides apoptóticos ha mejorado las tasas de fertilidad en las técnicas de reproducción asistida. (Makker *et al.*, 2008; Said *et al.*, 2005).

MACS provee pureza y recuperación óptima con resultados consistentes y fiables. Técnicamente es un procedimiento conveniente con un sistema fácil de aplicar en cualquier laboratorio. Provee de resultados rápidos dado los cortos períodos de incubación y la separación de las partículas después del procedimiento no es necesaria (Said *et al.*, 2005; Makker *et al.*, 2008;).

Otra característica que se ha estudiado es el potencial Zeta o potencial electroquinético de los espermatozoides. Este es el potencial eléctrico que se produce en el plano de desplazamiento del espermatozoide entre su membrana plasmática y el entorno que lo rodea. Los espermatozoides maduros poseen una carga eléctrica entre -16mV y -20mV. Este potencial o carga eléctrica disminuye con la capacitación espermática o con la exposición a neuro-aminidasas uterinas y liquido folicular (Chan *et al.*, 2006).

Se ha medido el potencial zeta de los espermatozoides humanos X e Y por dos métodos distintos: Espectrofotometría de luz electroforética y con un prisma de laser rotatorio. Los espermatozoides X e Y se separaron con electroforesis de flujo libre y las purezas de dicha separación fueron determinadas a través de tinciones con mostaza quinacrina. El potencial zeta de la fracción que contenía más de 80% de espermatozoides "Y" fue aproximadamente -16mV. En cambio en la fracción con más de 95% de espermatozoides "X" fue de -20mV. En otras palabras, la carga neta negativa en la superficie de las células espermáticas con cromosoma "X" es mayor que la del espermatozoide "Y" (Ishijima *et al.*, 1991).

Otros estudios se han realizado con semen de toro para establecer la heterogenidad de la superficie de los espermatozoides. Cuando se utilizó sistemas de partición de dos fases acuosas sin carga los cuales detectan proteínas sin carga asociadas a la superficie del espermatozoide se producían dos poblaciones notorias. Utilizando sondas específicas de ADN para el cromosoma Y, se demostró que una de estas poblaciones era rica en espermatozoides Y. Esta población consistió en un 80% de espermatozoides Y y un 20% de espermatozoides X. Todos los espermatozoides que habían comenzado con la reacción del acrosoma también eran incorporados en esta población y por ende la composición de cromosoma sexual de este grupo es incierto (Cartwright *et al.*, 1993 ; Iqbal y Hunter, 1995).

Se puede resumir que existen y se han estudiado un gran número de tecnologías con el fin de seleccionar y separar espermatozoides en distintas especies, entre ellas el equino, con los objetivos principales de purificación para mejorar las tasas potenciales de fertilización o para manipular el sexo de la progenie desde un momento pre-fertilización. Sin embargo a pesar de la variedad de tecnologías todavía no existe una que reúna características de ser económica, práctica y de fácil implementación y disponibilidad.

Esto generó el objetivo de este estudio para probar una técnica accesible y que no afecte los parámetros espermáticos como lo hace la citometría de flujo para separar espermatozoides que contengan el cromosoma sexual X de Y en semen equino a través del uso de nano-partículas magnéticas.

II. HIPÓTESIS

- El uso de Nano-partículas magnéticas separa eficazmente espermatozoides X de espermatozoides Y manteniendo la viabilidad y atributos básicos asociados a la capacidad fertilizante en semen equino.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar si el uso de nano-partículas magnéticas logra separar espermatozoides equinos "X" de "Y" en forma eficaz y mantener la tasa de viabilidad espermática.

Objetivos Específicos

1. Determinar la tasa de separación de espermatozoides X de espermatozoides Y post tratamiento, verificado por la prueba de FISH.
2. Determinar la tasa de espermatozoides viables después del proceso de sexado verificado con la tinción vital eosina-nigrosina y test hipoosmótica (HOST).
3. Determinar la fertilidad del semen sexado inseminando yeguas con semen fresco sexado.
4. Determinar el sexo de los fetos producidos con semen sexado, por ultrasonografía transrectal a los 125 días de gestación.

IV. MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental esquemático

a. Lugar físico y momento del estudio

El estudio se llevó a cabo en las dependencias del Centro de Medicina Reproductiva Equina BIOTEQ ubicado en la comuna de Paine, Región Metropolitana, Chile. Aquí se realizaron los procesos de colecta de semen, análisis de semen, sexado de semen con nano-partículas magnéticas y fijación de las muestras para la prueba de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Posteriormente en el laboratorio de Genómica de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Mayor, Santiago, Chile, se realizó el resto de la prueba de FISH y la determinación de las proporciones de espermatozoides X e Y.

El estudio fue realizado entre Octubre del año 2015 y Mayo del año 2016.

b. Colecta de Semen

Se utilizaron 30 eyaculados provenientes de 5 padrillos de distintas razas (1 Árabe, 2 Criollo Chileno, 1 Cuarto de Milla y 1 Holsteiner) de entre 7 y 12 años de edad con fertilidad comprobada. Fueron colectados utilizando una yegua en celo como maniquí y una vagina artificial modelo Missouri. Previo a la colecta el pene fue higienizado con agua limpia y tibia en forma exhaustiva para disminuir la contaminación del eyaculado. En una primera fase todos los padrillos que venían con actividad sexual activa fueron colectados de igual forma cada 24 horas por 7 días hasta lograr el estado de estabilización de eyaculación diaria de espermatozoides o Daily Sperm Output (DSO). Posteriormente las colectas fueron dos veces por semana hasta completar un total de 6 eyaculados por padrillo y por lo tanto 30 eyaculados totales para los fines del estudio y se procedió a sexar los 30 eyaculados con la técnica de Nanopartículas (NP) magnéticas.

c. Evaluación del Eyaculado

Los eyaculados obtenidos fueron filtrados con papel de celulosa en la misma vagina artificial al momento de la eyaculación para prevenir todo tipo de suciedad y contenido de plasma seminal proveniente de la tercera fracción del eyaculado. Posteriormente en el laboratorio se calculó la concentración de cada eyaculado utilizando un espectrofotómetro ARS 590 A. Una alícuota de 180 μ l de semen sin diluir fue adicionada a la cubeta proporcionada por el espectrofotómetro que ya contenía 3,4 ml de formalina cristalina al 10%. Este paso se repitió 2 veces para todos los eyaculados y se calculó el promedio

de los 2 valores obtenidos. Posteriormente todos los eyaculados fueron diluidos con diluyente comercial Equipro® de Minitub calculando estandarizar todos a una concentración de 50 millones de espermatozoides (SPZ) por mililitro. Se utilizó solo 30 ml de esta nueva dilución y fueron depositados 15 ml (750 mill de spz) en dos tubos de 15cc para centrifugación por 15 minutos a 350 g.

d. Preparación para el sexado del semen

Después de la centrifugación se retiró el sobrenadante de cada tubo y el pellet de espermatozoides (600×10^6 spz debido a una pérdida de 20% en el sobrenadante) fue re-diluido con 6 ml de medio HTFw® (fluido tubárico humano) de Irvine Scientific para lograr una concentración de 100 millones de spz/ml (Fotografía N°1). Un tubo no fue expuesto al protocolo de sexado con NP y formó el grupo control el cual permaneció cubierto de la luz y a temperatura ambiente (22 a 24 °C). La otra fracción si fue expuesta al protocolo de sexado con NP y formó el grupo en estudio.

Se determinó la viabilidad espermática de cada eyaculado utilizando la tinción vital de eosina-nigrosina y test hipoosmótico (HOST) inmediatamente después de la centrifugación estableciendo esto como el tiempo cero (T0).

La técnica de eosina-nigrosina se efectuó depositando una gota de 10 microlitros de semen en un extremo de un portaobjetos y de la misma forma a un lado de ella otra gota de igual volumen de la tinción. Ambas fueron mezcladas gradualmente usando una pipeta Pasteur de 1 ml desechable para luego realizar un barrido con un segundo portaobjetos en 45 grados a lo largo del portaobjetos que las contenía. Se dejó secar sobre platina térmica a 37 grados Celsius para su posterior observación y evaluación. Esta consistió en observar y contabilizar un total de 100 espermatozoides registrando por separado los que se encontraban traslucidos a la luz y los teñidos por la tinción de eosina-nigrosina. Considerando los teñidos como los dañados a nivel de membrana plasmática o muertos. Este proceso se repitió 3 veces para luego calcular un promedio.

Para el test hipoosmótico se preparo una solución de lactosa al 11% y se procedió a mezclar una alícuota de 100 microlitros de semen con 1 mililitro de la solución de lactosa y se dejó incubar por 60 minutos a 37 grados Celsius. Posteriormente se efectuó un barrido sobre un portaobjetos de similar forma como descrito anteriormente para la técnica de tinción eosina-nigrosina y se observó y evaluó al microscopio. Se contabilizó un total de 100 espermatozoides registrando los que se observaban aumentados de volumen o hinchados (considerados con membrana íntegra y funcional) versus los que se observaban sin alteración en su forma. Este procedimiento se repitió 3 veces y se calculó un promedio para cada muestra.

Posteriormente se repitió la determinación de viabilidad con ambas técnicas para el grupo en estudio terminado el proceso de sexado con NP y para el grupo control al mismo tiempo.

e. Sexado con Nano-partículas Magnéticas

Las Nano-partículas utilizadas son a base de Magnetita y recubiertas con Sílica y tienen un diámetro de 50 nm, siendo fabricadas por la empresa Clemente Associates Inc® en Madison, Estados Unidos (Fotografía N°1). Antes de comenzar el proceso se verificó que las esferas de Nanopartículas (NP) magnéticas estuvieran suspendidas invirtiendo el tubo que las contiene. La suspensión que forman estas NP es de color negro y debe estar homogénea antes de añadirla a la solución de espermatozoides con medio HTFw. (Fotografía N°2)

Se utilizó una relación 3:1 de perlas : espermatozoides. El tubo con la fracción control esperó a temperatura ambiente sin adición de NP. La fracción en el tubo en estudio fue mezclada con la suspensión con NP y se incubó 4 minutos a temperatura ambiente (Anexo N°3) realizando durante la misma una inversión o rotación manual suave del tubo para asegurar el contacto de las NP con los espermatozoides. Para calcular la cantidad de suspensión con nano-partículas a adicionar se consideró que 1 ml de solución contenía 8,7mg de nano-partículas teniendo en cuenta que 1mg de éstas contiene 1×10^9 perlas magnéticas. De ese modo, para respetar la relación 3:1 (perlas : spz) necesitamos añadir un total de 1800 millones de perlas magnéticas para 600 millones de espermatozoides. Por lo tanto necesitábamos 1,8 mg o 0,2ml de la solución que las contenía.

Después del período de incubación de 4 minutos, se colocaron ambos tubos (control y estudio) contra el magneto por 20 minutos (Fotografías N°4 y N°5). El magneto está compuesto por tres zonas circulares magnéticas contenidas dentro una estructura de acrílico. Una banda elástica se utilizó para mantener ambos tubos unidos al magneto. Las NP están cargadas negativamente en medios donde el pH esta sobre 7,0. Por lo que los espermatozoides "Y" que tienen carga positiva (menos potencial zeta negativo que los SPZ X) a nivel de membrana fueran atraídos por estas perlas negativas y luego hacia las 3 zonas circulares magnéticas. Los espermatozoides "X" se mantuvieron en suspensión sin adherirse a estas zonas en la pared interna del tubo.

Pasado los 20 minutos de colección de espermatozoides "Y" y manteniendo ambos tubos junto al magneto, se vació la solución del tubo en estudio aun en suspensión en un nuevo tubo de 15 ml. Se aseguró de que las NP que están adheridas a la pared del tubo no se cayeran hacia la solución virviendo el contenido lentamente y sin despegar el tubo del magneto en ningún momento. (Fotografía N°6).

Ambas fracciones o tubos (control y estudio) fueron evaluadas por viabilidad después de los 20 minutos de exposición al magneto a través del uso de tinción vital eosina nigrosina y test hipoosmótico (HOST) y así comparar los resultados de viabilidad obtenidos con los de tiempo 0 posteriores a la centrifugación.

f. Prueba de Hibridación in situ Fluorescente (FISH)

Primera Etapa: Hipotonía o Fijación

Esta primera etapa fue procesada en el mismo laboratorio donde se colectó, evaluó y sexó el semen. La etapa de Hipotonía o Fijación consistió en descondensar la cromatina de la cabeza del espermatozoide logrando que deje de estar compactada. Luego se congeló cada muestra a -20 grados Celsius y fue transportada al laboratorio de genómica donde se continuó con la prueba de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH). De este modo nos permitió hacer todas las colectas de semen en forma continua e intensiva para luego llevar todas las muestras fijadas y congeladas para procesarlas de la misma forma y en corto tiempo en el laboratorio de genómica.

Para esto se siguieron los siguientes pasos:

- La solución obtenida después del proceso de sexado anteriormente descrito, que debería contener la mayoría de los espermatozoides "X", se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet fue re-suspendido y homogeneizado con 2 mililitros de una solución de cloruro de potasio (KCl) 0,05 M. Se dejó reposar 15 minutos a 37 grados Celsius dentro de una estufa.
- Posteriormente se volvió a centrifugar a 1200 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se descartó y el nuevo pellet fue diluido y homogeneizado con una solución de fijación compuesta por Metanol y Acido Acético en relación 3:1 (M3:AA1) permaneciendo 30 minutos en la heladera a 4 grados Celsius. La solución de metanol con acido acético debió ser preparada con no más de 60 minutos de anticipación y mantenida a 4 grados Celsius previo a su uso.
- Una vez cumplido el tiempo de 30 minutos a 4 grados Celsius, la muestra fijada fue vertida a un tubo Eppendorf para su posterior congelación a -20 grados Celsius y fue almacenado un máximo de 60 días y para luego ser transportado al laboratorio de genómica donde se continuó con la prueba de FISH para determinar la proporción de espermatozoides X en la muestra.

Se utilizó un kit de sonda para ADN marca Metasystems® de origen Alemán y de nombre XCP GREEN (Xcycling chromosome paint). Estas sondas son específicas para cromosomas y tiñen en este caso al cromosoma X de color verde como indica el nombre comercial en inglés. Los preparados obtenidos fueron observados con microscopía con-

focal, utilizando el software computacional IMAGE-J de FIJI® para determinar la proporción de espermatozoides con cromosoma X (Anexos N°7, N°8, N°9 y N°10).

g. Prueba Biológica de Fertilidad

Se inseminaron 4 yeguas con semen sexado (200 millones de spz con motilidad progresiva) utilizando la técnica intra-cornual profunda. Previo a la inseminación, se calculó el número de espermatozoides totales a sexar para terminar con la dosis inseminante indicada. Las yeguas fueron controladas por ecografía transrectal desde el inicio de cada celo y se les administró una dosis de deslorelina (1mg) cuando se observó un folículo dominante ≥ 35 mm y presencia de edema uterino grado 2 o más (escala 0 a 3). La deslorelina fue aplicada ese día a las 20:00 y a las 36 horas de haber sido inducidas (8:00 de la mañana del día sub-siguiente) se inseminaron las yeguas con semen fresco sexado con nano-partículas, utilizando espermatozoides con cromosoma X. Se monitorearon ecográficamente a las 6 y 12 horas después de la inseminación para confirmar ovulación.

Posteriormente se efectuó monitoreo de la gestación a los 30 y 60 días y finalmente se efectuó la determinación de sexo del feto a los 125 días de gestación por medio de ultrasonografía transrectal. La determinación del sexo fetal se realiza observando las gónadas fetales las cuales se encuentran en la zona caudal de la cavidad abdominal. Los testículos en los fetos machos se observan con una ecogenicidad homogénea en la totalidad de la gónada y se puede observar una línea longitudinal central hiperecica que representa al mediastino testicular. Los ovarios en los fetos hembras se observan con dos áreas de ecogenicidad distinta y demarcadas dentro del órgano ocupando una zona externa correspondiente a la corteza y una interna correspondiente a la médula.

Análisis Estadístico

Las variables independientes con las que se trabajó en este estudio fueron padrillo (n=5), eyaculados (n=30) y grupo (control y sexado).

Las variables dependientes con la que se trabajó en este estudio fueron la de viabilidad espermática (evaluada con tinción eosina-nigrosina y con el test hipoosmótico) y solo en el grupo sexado, también la variable de concentración.

El efecto de las variables independientes sobre las variables dependientes fueron evaluadas con ANOVA utilizando el software Graph Pad 6.0. Así también se aplicó el test de student para comparar el grupo sexado con NP con el control.

Los valores fueron expresados como media +/- su desviación estándar y el nivel de significancia estadística fue de $P < 0,0001$ para expresar tendencias.

V. RESULTADOS

Los resultados para la variable Viabilidad Espermática (VE) se muestran en la Tabla N°1.

Tabla N°1: Valores de viabilidad espermática (VE) determinados por tinción de eosina-nigrosina y test hiposmótico (HOST).

		EYAC 1			EYAC 2			EYAC 3			EYAC 4			EYAC 5			EYAC 6		
		T0	Ctrl	Sex	T0	Ctrl	Sex	T0	Ctrl	Sex	T0	Ctrl	Sex	T0	Ctrl	Sex	T0	Ctrl	Sex
PADRILLO 1	E-NIG	87	85	91	91	87	92	90	88	91	89	84	90	87	85	91	86	83	90
Criollo	HOST	84	85	86	88	85	93	87	87	92	86	82	88	88	83	90	88	85	92
PADRILLO 2	E-NIG	83	81	81	86	86	86	86	87	88	85	81	90	87	84	91	85	81	89
Árabe	HOST	81	82	81	82	81	85	82	83	82	81	80	88	84	83	89	82	79	88
PADRILLO 3	E-NIG	86	83	86	84	81	88	85	81	90	88	87	85	84	81	83	86	85	81
C.Milla	HOST	82	80	84	80	80	87	84	82	89	83	80	81	80	81	83	87	83	81
PADRILLO 4	E-NIG	81	76	87	79	77	85	80	77	87	81	80	87	82	82	81	80	79	81
Criollo 2	HOST	78	75	88	75	77	82	77	76	85	76	76	86	78	77	79	77	74	78
PADRILLO 5	E-NIG	78	75	75	76	75	84	77	76	77	75	73	71	78	75	74	76	76	74
Holsteiner	HOST	75	76	72	73	71	84	75	71	74	73	72	70	74	73	74	73	71	72

Con la tinción de eosina-nigrosina se observó, en todos los padrillos, un aumento significativo ($p < 0,0001$) de la proporción de espermatozoides viables en las muestras sexadas con respecto al grupo control y al T0 y no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el T0.

Con el HOST se observó un aumento significativo ($p < 0,0001$) de la tasa de VE en el grupo sexado con respecto al grupo control y al T0 en cada padrillo. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y las determinaciones de VE a tiempo cero en cada padrillo. Se ilustra la distribución de los datos y estas diferencias tanto para eosina-nigrosina como para test de HOST en los gráficos N°1, N°2, N°3 y N°4.

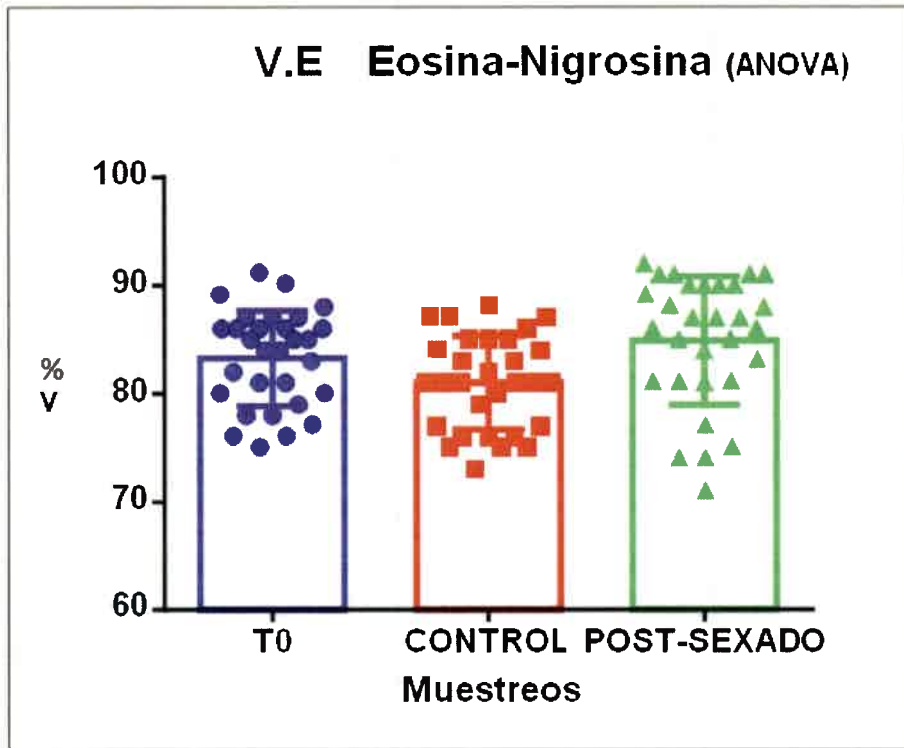


Grafico N°1: Distribución de los datos de viabilidad espermática (VE) del estudio para tiempo cero (T0), grupo control y grupo sexado con NP determinado por tinción vital de eosina nigrosina (ANOVA)

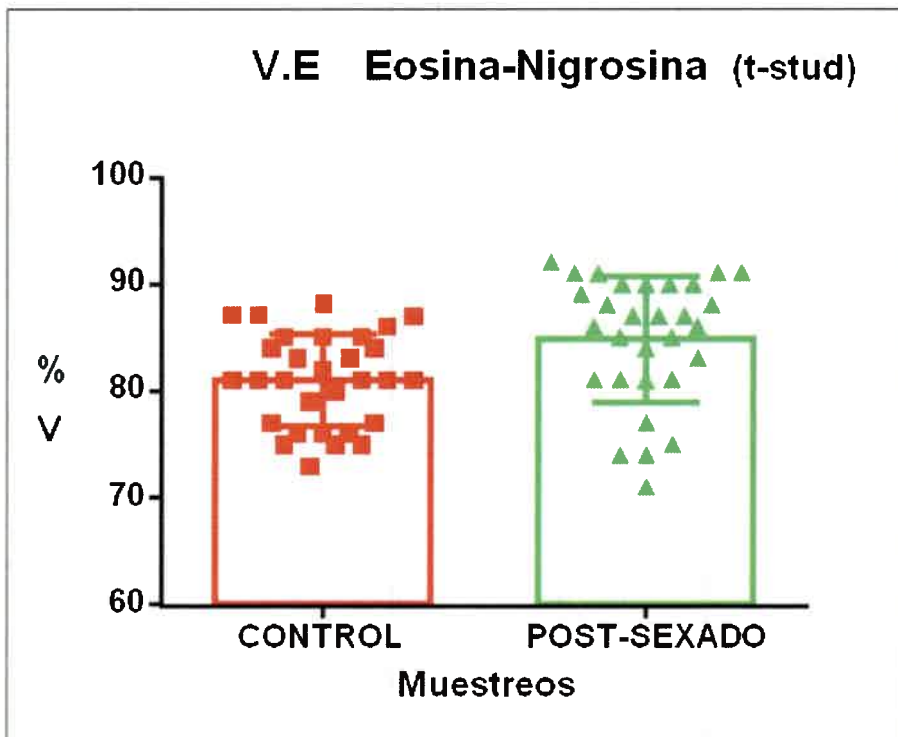


Grafico N°2: Distribución de los datos de viabilidad espermática (VE) del estudio para grupo control y grupo sexado con NP determinado por tinción vital de eosina nigrosina(test de student).

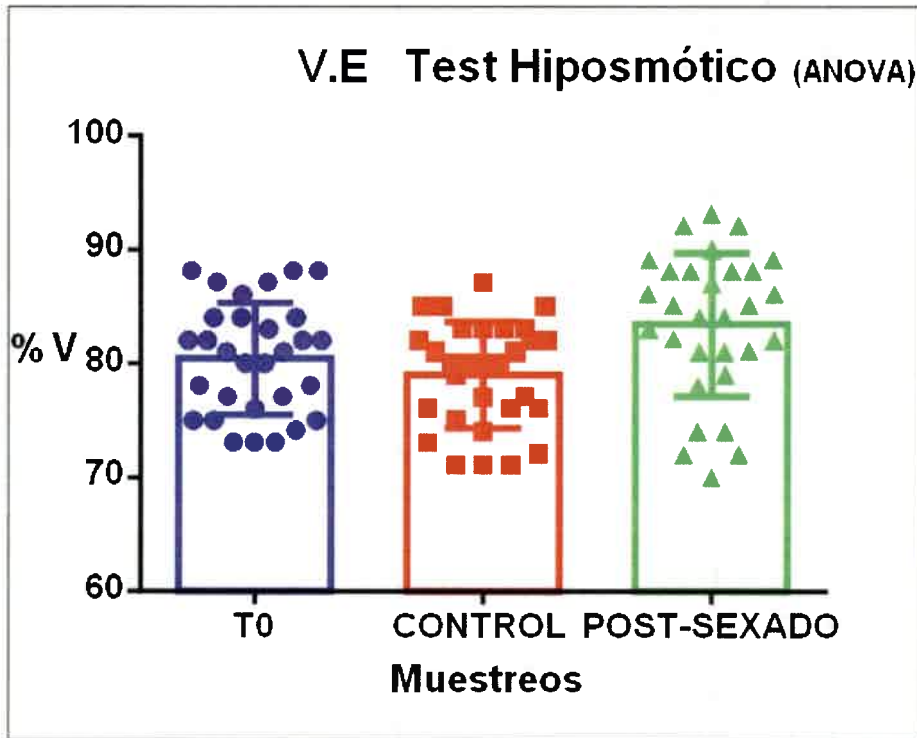


Grafico N°3: Distribución de los datos de viabilidad espermática (VE) del estudio para tiempo cero (T0), grupo control y grupo sexado con NP determinado por test hiposmótico (HOST) (ANOVA)

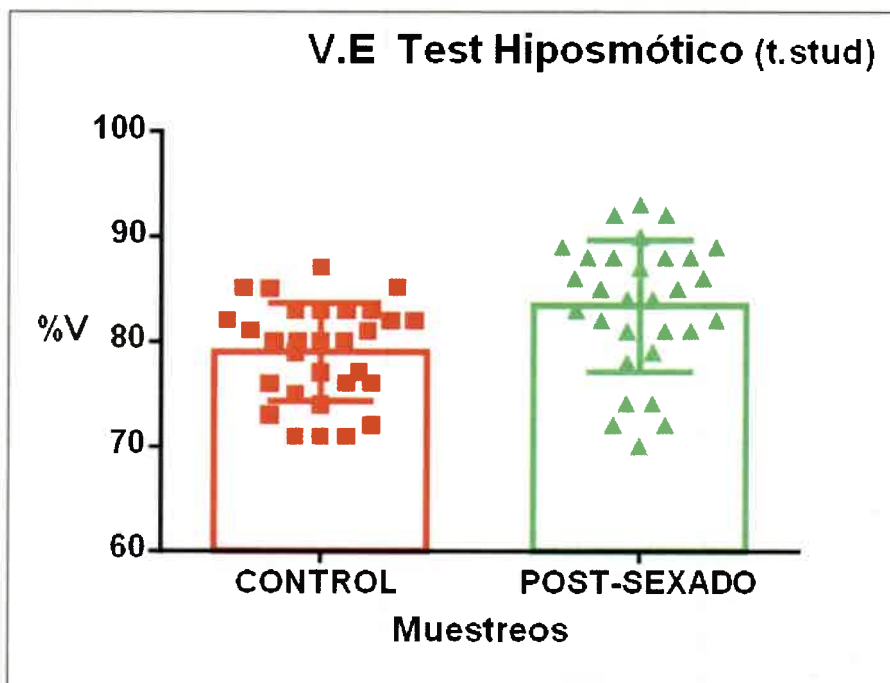


Grafico N°4: " Distribución de los datos de viabilidad espermática (VE) del estudio para grupo control y grupo sexado con NP determinado por Test hiposmótico (HOS)" (test de student).

La variable concentración en el grupo sexado con NP tuvo un valor promedio en el estudio de un 55% con respecto al valor promedio a tiempo cero (T0). Lo cual demuestra para este estudio que el proceso de sexado elimina en promedio un 45% de espermatozoides de cada muestra. Esta reducción en los valores de concentración demostraron ser estadísticamente significativos ($p < 0,0001$). En el gráfico N°5 se muestran las diferencias de concentración promedio para el estudio entre los grupos y a tiempo cero (T0).

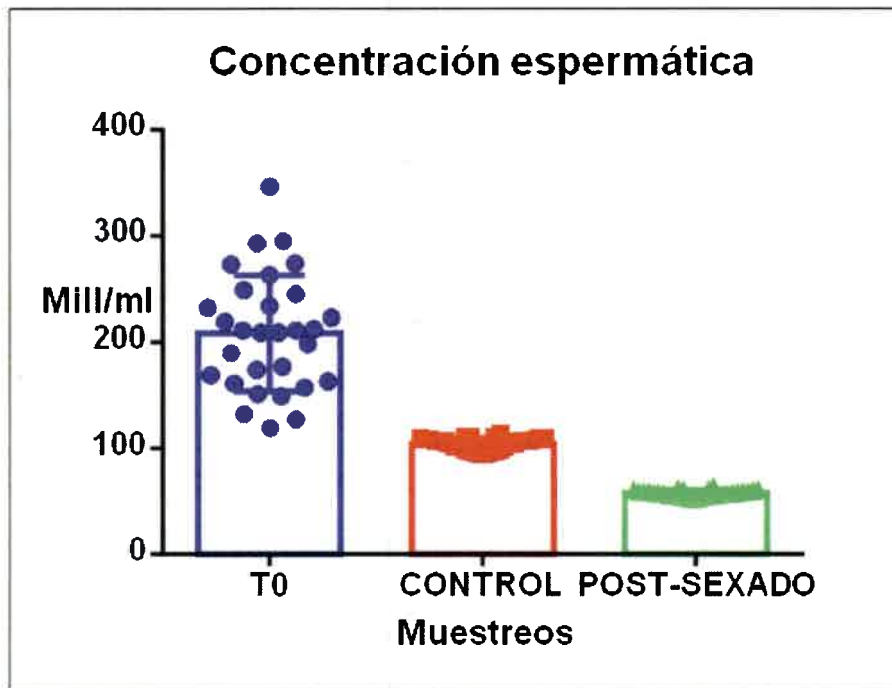


Gráfico N°5: Distribución de los datos de concentración espermática del estudio para tiempo cero (T0), grupo control y grupo sexado con NP. (ANOVA)

A través de la prueba de FISH utilizando la sonda XCP GREEN de Metasystems® se determinó con microscopía confocal y el uso de el software IMAGE-J de FIJI® una proporción promedio de espermatozoides que contenían el cromosoma X de 91,49% \pm 3,1%. Los valores mínimos y máximos encontrados de esta proporción en los 30 eyaculados evaluados fueron de 89% y 95%. La siguiente tabla muestra las proporciones de espermatozoides X de cada uno de los 30 eyaculados procesados del estudio y los promedios obtenidos por padrillo y total del estudio.

Tabla N°2: Proporciones de espermatozoides X determinados por la prueba de FISH.

	Eyac. 1	Eyac. 2	Eyac. 3	Eyac. 4	Eyac. 5	Eyac. 6	Promedio
Padrillo 1	89%	91%	92%	90%	90%	91%	90,50%
Padrillo 2	91%	92%	92%	94%	94%	92%	92,50%
Padrillo 3	90%	89%	91%	92%	91%	91%	90,66%
Padrillo 4	94%	92%	94%	93%	95%	95%	93,83%
Padrillo 5	89%	91%	90%	91%	89%	90%	90,00%
							Promedio final
							91,49%

Prueba Biológica:

De las 4 yeguas inseminadas con la técnica intracornual profunda y depositando 200 millones de espermatozoides motiles progresivos, 3 de ellas se preñaron al primer ciclo. La cuarta yegua se preñó en su segundo ciclo. Los controles ecográficos de gestación a los 30 y 60 días no evidenciaron alteraciones ni pérdidas gestacionales. La determinación del sexo fetal a los 125 días de gestación reveló la presencia de gónadas hembras (ovarios) al ultrasonido transrectal en las 4 gestaciones. Las gónadas fetales mostraban dos zonas ecoicas debidamente delimitadas conformando así corteza y medula ovárica.

VI. DISCUSION

El presente estudio demostró que el uso de Nano-partículas magnéticas es una técnica efectiva para la separación de espermatozoides que contienen el cromosoma "X" y el cromosoma "Y". A la fecha de realización de este estudio no existen publicaciones que reporten la capacidad de sexado de las NP en semen equino. Sí existen variadas publicaciones sobre el uso de semen sexado equino con citometría de alto flujo y sus resultados a campo así como publicaciones del uso de NP para purificar semen humano y de otros machos de interés zootécnico o comercial como toros y verracos.

Panarace en el 2014 publicó los primeros resultados del uso de semen sexado a campo en equinos. Este estudio fue llevado a cabo durante las temporadas reproductivas 2009, 2010 y 2011. Estos autores utilizaron 938 ciclos sincronizados de yeguas para inseminación artificial. La tasa de recuperación embrionaria fue de un 51,9%. La tasa de gestación post transferencia fue de 81,5%. No se observaron diferencias en la tasa de recuperación de embriones entre ciclos dónde se inseminó pre ó post ovulación, ni tampoco, cuándo se varió la dosis inseminante. Sí se observaron diferencias entre padrillos utilizados en este estudio. La efectividad de la clasificación espermática por sexo confirmada por ultrasonido fue de un 90,3%. Finalmente, la eficiencia total fue de un 39% (gestaciones de hembra por ciclo, significando que para obtener una gestación de hembra confirmada a los 75 días fue necesario realizar 2,5 lavajes uterinos).

Samper y col. (2012) sostuvo que clasificar semen equino en dos poblaciones separadas en X e Y puede ser llevado a cabo con éxito. Para ello el semen del padrillo puede ser transportado a un laboratorio que realice el proceso, pero la yegua a inseminar debe estar cerca de este laboratorio. Las tasas de fertilidad cuando se usan 20 a 40 millones de espermatozoides sexados son de un 60% por ciclo. Este procedimiento puede ser implementado en programas de transferencia embrionaria sin efectos deletéreos en las tasas de preñez ni aumento en las de muerte embrionaria temprana.

En otro estudio en toros, se demostró que fenotipos espermáticos aberrantes coinciden con la expresión de determinantes únicos a nivel de membrana, que pueden ser marcados objetivamente para análisis de semen y seleccionados para posterior purificación (Odhiambo *et al.*, 2014). Se evaluó un método de purificación utilizando nano-partículas magnéticas que removían los espermatozoides defectuosos ($\geq 30\%$ de la muestra) en semen de toros y mejoraba la viabilidad y habilidad fertilizante de los eyaculados tanto *in vitro* como *in vivo*. Se utilizaron dos tipos de nanopartículas, unas recubiertas con anticuerpos contra Ubiquitina (presente en la superficie de membrana de espermatozoides defectuosos) y otras cubiertas con Lectinas PNA que se unen a glicanos expuestos en la membrana acrosomal interna. Se utilizaron 798 ciclos en vacas y se logró una tasa

de concepción de $64,5\% \pm 3,7\%$ utilizando dosis de 10 millones de espermatozoides nano-purificados con PNA y se comparó con dosis no purificadas de 20 millones de espermatozoides que obtuvieron tasas similares pero usando el doble de la dosis y dosis de 10 millones no purificadas donde la tasa de concepción bajó a 53%. Además se comprobó que las gestaciones obtenidas no incrementaron las tasas de muerte embrionaria o aborto a las ya descritas y que el total de nacimientos de hembras fueron crías sin alteraciones (Odhiambo *et al.*, 2014).

Una de las principales razones para ahondar en el uso de técnicas de I.A. a bajas dosis ha sido el uso de semen sexado con citometría de flujo en equinos. El citómetro, como fue descrito anteriormente, separa espermatozoides X de Y en forma eficaz pero desafortunadamente actualmente sólo 15 millones de espermatozoides pueden ser sexados por hora. A esta tasa de separación, tomaría varios días lograr una dosis inseminante convencional de 800-1000 millones de espermatozoides. Razón por la cual ha sido mandatorio el uso de técnicas de I.A. bajas dosis (Lindsey *et al.*, 2001). En el presente estudio con Nano-partículas se observó que el uso de I.A. de bajas dosis y/o de depósito intracornual profundo con 200 millones de espermatozoides móviles progresivos post sexado lograron tasas de gestación de 75% al primer ciclo en 4 yeguas.

Lindsey en el 2001, demostró que la IA histeroscópica producía mayores tasas de preñez que la I.A. profunda con pipeta flexible guiada trans-rectal y no había diferencia entre utilizar semen no sexado versus semen sexado con citometría (Lindsey *et al.*, 2001). En nuestro estudio a pesar de que no se compararon distintas técnicas de I.A. y fue muy bajo el número de yeguas inseminadas, posiblemente se podría inferir que no sería necesario el uso de éstas técnicas de bajas dosis y/o profundas ni la utilización del video-endoscopio.

La viabilidad observada en este estudio, donde se observó que no fue afectada e incluso aumentaba o mejoraba después del proceso de sexado con NP, contrasta enormemente con lo observado cuando se utiliza el citómetro de flujo para sexar semen equino. Debido a que son varios los procesos químicos y mecánicos a los que son sometidos los espermatozoides en el FACS, el proceso en general es lento y las dosis logradas en un tiempo determinado son bajas y por ende la técnica es poco práctica. Balao Da Silva en el 2010 evaluó el estado de la membrana plasmática del espermatozoide después de ser sexado con el citómetro de flujo. Realizaron 3 pruebas: 1) habilidad de unión a ovocitos de cerda, 2) integridad de acrosoma y 3) detección de fosforilación en residuos tirosina. Todas estas pruebas se hicieron después de períodos de incubación (0h, 1,5h y 3h) en medios de capacitación. Demostraron que los espermatozoides sexados no mostraban diferencias en su capacidad de unión al ovocito comparado con el grupo control no sexado. Sin embargo, los espermatozoides sexados eran más propensos a realizar la reacción acrosomal cuando se incubaban por 1,5 y 3 horas y tenían más altas tasas

de fosforilación en residuos tirosina al inicio del periodo de incubación. Por lo tanto los espermatozoides sexados aparentemente tienden a estar en un estado más avanzado de desestabilización de membrana, lo que puede estar relacionado con el proceso de pre capacitación (Balao da Silva *et al.*, 2013). En otro estudio, este mismo autor determinó el efecto del sexado de espermatozoides equinos por citometría de flujo sobre los niveles de calcio y energía internos del espermatozoide. La molécula de ATP es necesaria para el movimiento flagelar y para la traducción de señales vía la fosforilación de proteínas. Los niveles de calcio están relacionados con la modulación del movimiento flagelar y por lo tanto los patrones de motilidad del espermatozoide. Se determinó que después del proceso de sexado la motilidad total y progresiva disminuyó considerablemente. Además las poblaciones de espermatozoides apoptóticos y muertos aumentó significativamente. Por lo tanto el número de células vivas disminuyó notoriamente. Se correlacionó en paralelo con una disminución del calcio intracelular en estas células. Los niveles promedio de ATP disminuyeron un 40% post sexado relacionado con la baja motilidad espermática. En resumen este estudio demostró que existe una relación en la disminución de ATP y calcio intracelular con la disminución notoria de los parámetros quinéticos del espermatozoide (Balao da Silva *et al.*, 2010).

En nuestro estudio el tiempo promedio entre que se colectó al padrillo y la dosis de semen fresco sexado estaba lista para ser inseminada, fue de 50 minutos promedio (45 a 60 minutos) considerando los procesos de centrifugación e incubación con las nano-partículas magnéticas y además una dosis de 200 millones de espermatozoides motiles progresivos. Esto hace que este método sea una herramienta práctica para el uso a campo en cualquier lugar.

Por lo anteriormente expuesto, sería importante continuar con los estudios en el uso de las NP en semen equino para criopreservar semen sexado mediante nano-partículas. Por un lado sería interesante determinar la fertilidad de las muestras sexadas cuando se refrigeren y transporten en caso que las yeguas no estén cercanas a los padrillos y por otro lado sería interesante evaluar la posibilidad de congelar y preservar genética ya sexada y evaluar el grado de fertilidad post descongelado. Sin duda lo que se avecina es promisorio, dado los resultados obtenidos con semen fresco en este estudio y comparándolos en paralelo con lo publicado para la citometría de flujo y sus efectos deletéreos sobre los espermatozoides equinos.

Por último es importante recalcar que la prueba de FISH es una herramienta certera para establecer la proporción de espermatozoides seleccionados en poblaciones X e Y. Ya existen variados reportes donde se ha utilizado esta prueba con semen equino con distintos objetivos. En un estudio se determinó el nivel de aneuploidía en espermatozoides equinos. Se examinaron un total de 8800 células espermáticas y se registró una proporción de 0,496% de células aberrantes, 0,135% de aneuploidía para XX, 0,023%

de aneuploidía para XY, 0,102% para XY, 0,057% de diplodía y 0,18% de carencia de cromosoma sexual. Además pudieron determinar que la relación teórica de 1:1 esperada entre spx X y spz Y es real en la mayoría de los padrillos (Bugno *et. al*, 2010 y 2011).

Otros estudios han utilizado FISH para correlacionar la edad del padrillo con la aparición de aberraciones en espermatozoides. Se demostró que existe relación entre estos parámetros, encontrando que a mayor edad del padrillo existe mayor porcentaje de aberraciones cromosomales. Otro ejemplo que esta prueba es certera para detectar aberraciones cromosomales en espermatozoides equinos así como la relación entre espermatozoides X e Y en un eyaculado.

VII. CONCLUSIONES

La utilización de nano-partículas magnéticas compuestas de magnetita y recubiertas de sílica de un diámetro de 50nm y en una relación 3:1 con respecto a los espermatozoides equinos, es un método eficaz de separación de espermatozoides que contienen el cromosoma X de los que tienen el cromosoma Y.

La viabilidad espermática, evaluada mediante la tinción de eosina-nigrosina y el test hipoosmótico no se vio afectada por la utilización de estas NP y su interacción con los espermatozoides equinos durante el proceso de sexado.

La viabilidad espermática de las muestras sexadas aumentó con respecto al grupo control y esta diferencia fue estadísticamente significativa.

La concentración espermática de las muestras sexadas disminuyó en promedio un 45% de la concentración inicial.

El semen sexado utilizando NP magnéticas mantuvo su capacidad fertilizante y no generó pérdidas gestacionales tempranas.

La proporción del sexo hembra logrado en las gestaciones fue de un 100% utilizando las NP magnéticas como medio de sexado de semen equino para separar espermatozoides con cromosoma X.

ANEXOS



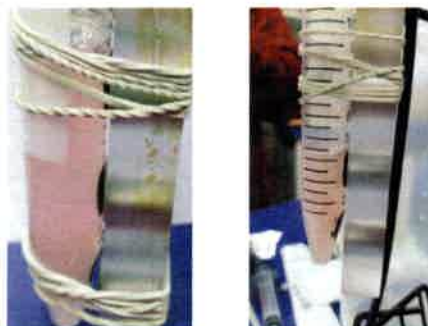
Fotografía N°1: Suspensión de Nano-partículas Magnéticas, Clemente Associates®



Fotografía N°2: Fluido Tubérico Humano, Irvine Scientific®



Fotografía N°3: Adición de Nano-Partículas a la suspensión de HTF y espermatozoides.



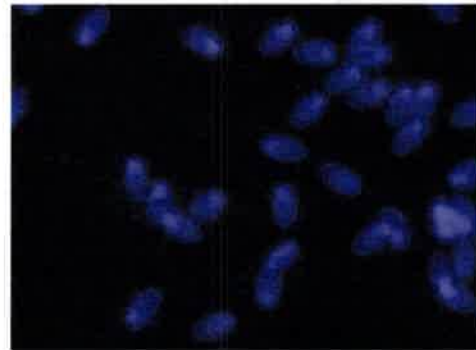
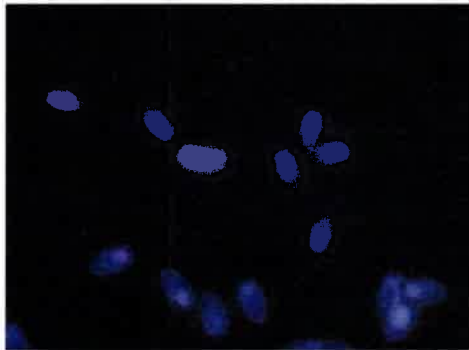
Fotografía N°4 y N°5: Separación o colección de espermatozoides Y hacia él magneto.



Fotografía N°6: Zonas de nano-partículas y espermatozoides "Y" adheridas a la pared del tubo posterior a la colección con el magneto.



Fotografías N°7 y N°8: Espermatozoides X exhibiendo cromatina con tinción XCP GREEN (Xcyting chromosome paint).



Fotografías N°9 y N°10: Espermatozoides X al microscopio con-focal con contraste DAPI.

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aasen E., Medrano JF.,(1990). Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8:1279-1281.
- Aitken CE., Ozanne SE.,(2013). Sex differences in developmental programming models. *Reproduction* 145(1):1-13.
- Aguilar JJ., Cuervo-Arango J., Santa Juliana L., (2015). Lunar cycles at mating do not influence sex ratio at birth in horses. *Chronobiology International* 32: 43-47.
- Alonso C., Morikawa MI, Castex CB, Pinto MR, Ortega N, Fanti T, Garaguso R, Franco MJ, Castañares M, Castañeira C, Losinno L, Miragaya MH, Mutto AA., (2015). Blastocoele fluid from in vitro- and in vivo-produced equine embryos contains nuclear DNA. *Theriogenology* 83(3):415-20
- Aurich C., Schneider J., (2014). Sex determination in horses. Current status and future perspectives. *Animal Reproduction Science* 146:34-341.
- Avery B., Jorgensen CB., Madison V., Greve T.,(1992). Morphological development and sex of bovine in-vitro fertilized embryos. *Molecular Reproduction and Development* 32(3):265-270.
- Balao-da Silva C., Morillo-Rodríguez A., Ortega-Ferrusola C., Gallardo-Bolaños J.M., Plaza-Dávila M., Miro-Morán A., Aparicio I.M., Tapia J.A., Peña F.J.,(2010). Effect of sex sorting on intracellular Ca²⁺ and ATP content of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 32:475-518.
- Balao da Silva C.M., Spinaci B., Bucci D., Giaretta E., Peña F.J., Marib G., Galeati G.,(2013). Effect of sex sorting on stallion spermatozoa: Heterologous oocyte binding, tyrosine phosphorylation and acrosome reaction assay. *Animal Reproduction Science* 141:68-74.
- Battut I., Colchen S., Fieni F., Tainturier D., Bruyas JF.,(1997). Success rates when attempting to non-surgically collect equine embryos at 144, 156 or 166 hours after ovulation. *Equine Veterinary Journal Supplement* 25:60-62.
- Beckelmann J., Budik S., Bartel C., Aurich C.,(2012). Evaluation of Xist expression in pre-attachment equine embryos. *Theriogenology* 78:1429-1436.
- Bongso T.A, Basrur P.K (1976). Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis. *The Veterinary Record*. 96(6):124-6.
- Bucca S.,(2005). Equine fetal gender determination from mid-to advanced- gestation by ultrasound. *Theriogenology* 64:568-571.
- Bugno M., Jablonska Z., Tischner M., Klukowska-Rotzler J., Pienkowska-Schelling A., Schelling A., Słota E.,(2010). Detection of Sex Chromosome Aneuploidy in Equine Spermatozoa Using Fluorescence In Situ Hybridization. *Reproduction in Domestic Animals* 45:1015-1019.
- Bugno-Poniewierska M., Kozub D., Pawlina K., Tischner M., Słota E., Wnuk M.,(2011). Determination of the Correlation between Stallion's Age and Number of Sex Chromosome Aberrations in Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 46:787-792.
- Cameron EZ., Linklater WL., Stafford KJ., Veltman CJ.,(1999). Birth sex ratios relate to mare condition at conception in Kaimanawa horses. *Behavioral Ecology* 10:472-475.

- Cameron EZ.,(2004). Facultative adjustment of mammalian sex ratios in support of the Trivers-Willard hypothesis: evidence for a mechanism. *Proceedings Biological Sciences* 22:271(1549):1723-1728.
- Cameron EZ., Linklater WL.,(2007). Extreme sex ratio variation in relation to change in condition around conception. *Biology letters* 3:395-397.
- Cartwright EJ., Harrington PM., Sharpe PT., (1993). Separation of bovine X and Y sperm based on surface differences. *Molecular Reproduction and Development* 34:323-328.
- Chan P., Jacobson J., Corselli J., Patton W.,(2006). A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertility and Sterility* 85:481-486.
- Checura C., Powers A., (2016). In vitro growth of small equine embryos after vitrification. *Journal of Equine Veterinary Science-abstracts* 41: 51-84.
- Choi YH., Gustafson-Seabury A., Velez IC., Hartman DL., Bliss S., Riera FL., Roldan JE., Chowdhary B., Hinrichs K., (2010). Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction* 140(6):893-902.
- Clulow JR., Evans G., Morris LHA., Maxwell WMC., (2009). Factors influencing the “sortability” of stallion spermatozoa into X- and Y- chromosome bearing populations. *Animal Reproduction Science* 113: 220-228.
- Cuervo-Arango J., Aguilar J., Vettorazzi ML., Martínez-Boví R., (2015). eCG concentrations, luteal structures, return to cyclicity, and postabortion fertility in embryo transfer recipient mares. *Theriogenology* 84(6):1003-13
- Curran S., Ginther OJ., (1991). Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology* 36(5):809-14.
- Curti G., Skowronek F., Vernochi R., Rodríguez AL., Rodríguez JC., Casanova G., Sapiro R.,(2014). Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MACS). *Reproductive Biology* 14:289-292.
- De Leon PM., Campos VF., Dellagostin OA., Deschamps JC., Seixas FK., Collares T.,(2012). Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). *Theriogenology* 77:694-698.
- Epstein CJ., Smith S., Travis B., Tucker G., (1978). Both X chromosome function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. *Nature* 27:500-503.
- Feugang J., Liao S., Crenshaw M., Clemente H., Willard S., Ryan P., (2015). Lectin-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for reproductive improvement. *Journal of Fertilization : In Vitro, IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology* 3(2).
- Flood PF., Betteridge KJ., Dicoee MS.,(1982). Transmission electron microscopy of horse embryos 3-16 days after ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 32:319-327.
- Garner D., (2001). Sex sorting mammalian Sperm: concept to application in animals. *Journal of Andrology* 22(4):519-526
- Garner D., (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65:943-957.
- Gledhill B.L., Lake S., Steinmetz L.L., Gray J.W., Crawford J.R., Dean P.N., Van Dilla M.A (1976). Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. *J Cell Physiol.* 87:367–376.

- Gutiérrez A., Granados J., Pintado B., De la Fuente J.,(2001). Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reproductive, fertility and development* 13(5-6): 361-365.
- Iqbal N., Hunter AG.,(1995). Comparison of various bovine sperm capacitation systems for their ability to alter the net negative surface charge of spermatozoa. *Journal of Dairy Science* 78:84-90.
- Ishijima S.A., Okuno M., Mohri H.,(1991). Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *International Journal of Andrology* 14:340-7.
- Jasko D.J., (1992). Evaluation of stallion semen. *Veterinary Clinincs of North America Equine Practice*. 8:129-48.
- Johnson LA., Welch GR., (1999). Sex preselection: High speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52:1323-1341.
- Kavanagh DM., Kersaudy-Kerhoas M., Dhariwal RS., Desmulliez MP., (2010). Current and emerging techniques of fetal cell separation from maternal blood. *Journal of Chromatography* 878:1905-1911.
- Lindsey A.C., Bruemmer J.E., Squires E.L.,(2001). Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction* 68:279-289.
- Machado M., Maia L., Magalhaes D., Oliveira J., Rezende T., Gomes M., Vaz de Melo M., Santos W., Silveira M., Da Silva J., Lima R., Ribeiro G.,(2015). Sex ratio of equine offspring is affected by the age of the mare and stallion. *Theriogenology* 84:1238-1245.
- Makker K., Agarwal A., Sharma R.,(2008). Magnetic activated cell sorting (MACS): Utility in assisted reproduction. *Indian Journal of Experimental Biology* 46:491-497.
- Martinez S., Zagrajczuk A., (2016). Application of ultrasound technique in early fetal gender determination: the field study. *Journal of equine veterinary science-abstracts* 41: 51-84.
- Monard AM., Duncan P., Fritz H., Feh C.,(1997). Variations in the birth sex ratio and neonatal mortality in a natural herd of horses. *Behavioral ecology and sociobiology* 41:243-249.
- Morris L., (2005). Challenges facing sex preselection of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89:147-157.
- Morris L., Hunter R., Allen W.R., (2000). Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. 118: 95-100.
- Odhiambo J., Dejarnette J.M., Geary T., Kennedy C., Suarez S., Sutovsky M., Sutovsky P., (2014). Increased Conception Rates in Beef Cattle Inseminated with Nanopurified Bull Semen. *Biology of Reproduction* 114:1-7.
- Panarace M., Pellegrini R:O, Basualdo M.O., Belé M:, Ursino D.A., Cisterna R., Desimone G., Rodríguez E., Medina M.J., (2014). First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. *Theriogenology* 81:520-525.
- Pinkel D., Lake S., Gledhill B.L., Van Dilla M.A., Stephenson D., Watchmaker G(1982). High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry* 3:1-9.
- Ramalho MF., Garcia JM., Esper CR., Vantini R., Alves BC., Almeida Jr IL., Hossepian de Lima VF., Moreira-Filho CA., (2004). Sexing of murine and bovine embryos by developmental arrest induced by high-titer H-Y antisera. *Theriogenology* 62(9):1569-1576.

- Rastan S., (1994). X chromosome inactivation and the Xist gene. *Current opinions in Genetic and Development* 4:292-297.
- Renaudin CD., Gillis CL., Tarantal AF., (1999). Transabdominal ultrasonographic determination of fetal gender in the horse during mid-gestation. *Equine Veterinary Journal* 31:483-487.
- Romagnano A., Richer CL., King WA., Betteridge KJ., (1987). Analysis of X-chromosome inactivation in horse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 35:353-361.
- Rorie RW., Lester TD., Lindsey BR., McNew RW.,(1999). Effect of timing of artificial insemination on gender ratio in beef cattle. *Theriogenology* 52:1035-1041.
- Said T., Grunewald S., Paasch U., Rasch M., Agarwal A., Glander H.,(2005). Effects of magnetic activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertility and Sterility* 83:1442-1446.
- Said T., Grunewald S., Paasch U., Rasch M., Agarwal A., Glander H.,(2006). Evaluation of sperm recovery following annexin-V magnetic-activated cell sorting separation. *Reproductive Biomedicine* 13:336-339.
- Samper JC., Morris L., Peña FJ., Plough TA.,(2012). Commercial breeding with sexed stallion semen: reality or fiction? *Journal of Equine Veterinary Science* 32:471-474.
- Sharpe JC., Evans KM., (2009). Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 71:4-10.
- Stout TA., Meadows S., Allen WR., (2005). Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Animal Reproduction Science* 87:268-281.
- Trivers RL., Willard DE.,(1973). Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 179:90-92.
- Walter I., Tschulenk W., Budik S., Aurich C., (2010). Transmission electron microscopy (TEM) of equine conceptuses at 14 and 16 days of gestation. *Reproduction, Fertility and Development* 22:405-415.
- Wood TC., White KL., Thompson DL Jr., Garza F Jr.,(1988). Evaluation of the expression of a male-specific antigen on cells of equine blastocysts. *Journal of Reproductive Immunology* 14(1):1-8.

75656