

Efecto de la suplementación con ciclodextrinas cargadas con colesterol al semen sexado bovino post-descongelación para su uso en producción *in vitro* de embriones

Ferré, L.¹*; Grötter, L.²; Fresno, C.³ y Cattaneo, L.²

¹INTA Rafaela, Santa Fe, Argentina.

²Facultad Ciencias Veterinarias, UNL, Santa Fe, Argentina.

³Grupo de Genómica Poblacional y Bioinformática, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Fertilización *in vitro*.

Espermatozoide.

Clivaje.

Blastocisto.

ADDITIONAL KEYWORDS

In vitro fertilization.

Sperm.

Cleavage.

Blastocyst.

INFORMATION

Cronología del artículo.

Recibido/Received: 14.10.2016

Aceptado/Accepted: 05.05.2018

On-line: 15.07.2018

Correspondencia a los autores/Contact e-mail:

ferre.luis@inta.gob.ar

RESUMEN

Los espermatozoides bovinos presentan una baja relación de colesterol/fosfolípidos en la membrana plasmática. Esta característica es importante ya que el colesterol juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad de la membrana espermática tras la congelación, y, por lo tanto, en la supervivencia del espermatozoide tras el proceso de criopreservación. El proceso de sexado podría agravar todavía aún más esta situación. El objetivo de este trabajo es estabilizar las membranas plasmáticas de espermatozoides sexados mediante el agregado de ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) post-descongelado y consecuentemente, prolongar su funcionalidad, aumentar su capacidad de fecundar ovocitos *in vitro* y producción de embriones. Para ello se trataron espermatozoides sexados con CLC a diferentes concentraciones e incubados por 15 minutos antes de evaluar el patrón de motilidad mediante un sistema computarizado CASA y fertilizar ovocitos *in vitro*. Los espermatozoides tratados con 3 mg de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol cada 1.20×10^6 espermatozoides presentaron mejor motilidad y vigor y se mantuvieron elevados durante el tiempo analizado. La concentración de 3 mg de CLC también produjo mayor clivaje, MOR/eBL, BL y embriones totales.

Effect of adding cholesterol-loaded cyclodextrin to thawed bovine sexed semen used for *in vitro* embryo production

SUMMARY

Bovine sperm have a low cholesterol/phospholipids ratio in the sperm plasma membrane. This characteristic is important due to cholesterol plays a key role in maintaining the structure and function of sperm membrane after freezing, and therefore, increasing sperm survival. This situation could be amplified in case of sexed semen. The aim of this study is to stabilize the plasma membranes of sperm sexed by adding cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC) postthaw and consequently extend their functionality, increase their ability to fertilize oocytes and produce embryos *in vitro*. Sexed sperm were treated with CLC at different concentrations and incubated for 15 minutes before evaluating different motility parameters by a computerized system (CASA) and fertilize oocytes *in vitro*. Sperm treated with 3 mg of methyl- β -cyclodextrin saturated cholesterol for each 1.20×10^6 of sperm, showed higher motility parameters and remained high during the analyzed period. The concentration of 3 mg of CLC also increased cleavage rate, early (MOR/eBL), late (BL) and total embryo development.

INTRODUCCIÓN

La técnica de producción *in vitro* de embriones (PIVE) en bovinos es relativamente nueva en el mundo (fines de los 80) (First and Parrish 1987, Gordon and Lu 1990, Lu *et al* 1987). En los últimos años, el crecimiento de la PIVE ha sido notorio debido principalmente a 1) gran eficiencia en el uso del semen y 2) mayor cantidad de embriones producidos en comparación con otras técnicas reproductivas. La eficiencia en el uso de se-

men se debe a que el proceso de fertilización se realiza micro-gotas lo cual genera un ahorro sustancial de semen (Greve and Madison 1991, Kato and Iritani 1993). La segunda ventaja comparativa tiene su fundamento en la posibilidad de colectar ovocitos de hembras con una alta frecuencia y en diversas condiciones fisiológicas (vacía, preñada, pre-púber) lo cual amplía enormemente el abanico de posibilidades en cuanto al avance genético y reducción del intervalo generacional (Kruip *et al* 1994, Looney *et al* 1994).

Del 100% de ovocitos puestos a madurar, entre 80% y 90% llegarán a Metafase II. De aquí el 70%-80% serán fertilizados y solo el 35%-45% llegarán al estadio de blastocisto en el día 7 de cultivo (Lonergan *et al* 2001). En caso de utilizar semen sexado, los porcentajes de fertilización y desarrollo embrionario son generalmente más bajos (Lu *et al* 1999, Zhang *et al* 2003). Esto se debería al efecto acumulado del proceso de sexado y posterior congelamiento/descongelamiento que los espermatozoides deben superar (Gosálvez *et al* 2011a, b, Rath *et al* 2009, Seidel and Garner 2002, Suh and Schenk 2003, Suh *et al* 2005).

La sobrevivencia de los espermatozoides de la mayoría de las especies de interés zootécnico al proceso de criopreservación está lejos de ser óptima (Barbas and Mascarenhas 2009, Medeiros *et al* 2002). Este problema se agrava si el semen es sometido al proceso de sexado previo a su congelación (Schenk *et al* 1999a). Está bien documentado el daño que puede ocurrir a los espermatozoides durante la criopreservación debido a factores tales como exposición a bajas temperaturas, estrés osmótico/mecánico, estrés oxidativo o una combinación de estos (Meyers 2005, Sieme *et al* 2015). A esto se le sumaría cambios perjudiciales en la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Parks and Graham 1992, Silva and Gadella 2006).

El shock por frío que ocurre durante el proceso de congelación causa el cambio de fase de los lípidos y en consecuencia afecta la fluidez de membrana (Pegg 2015). La criopreservación induce el agotamiento o salida de colesterol de la membrana plasmática, que a su vez provoca su desestabilización (Akhoondi *et al* 2011, Amann and Hammerstedt 1993, Bailey *et al* 2000, Curry 2000, Sieme *et al* 2015). Además, la congelación puede desencadenar procesos capacitantes no fisiológicos en mayor o menor medida que podrían conducir a una reacción acrosómica prematura y ulterior pérdida de la funcionalidad y viabilidad de la gameta (Bailey *et al* 2000, Cormier *et al* 1997, Pons-Rejraji *et al* 2009).

Al problema del bajo número de espermatozoides que sobreviven a la congelación/descongelación se le suma efectos colaterales del proceso de sexado. En estudios realizados sobre espermatozoides de un mismo eyaculado (factorial: congelado vs. fresco y no-sexado vs. sexado) revelaron que la congelación, y no el sexado, afecta negativamente la calidad del semen. No obstante, el proceso de sexado, y no la congelación, reduce la motilidad de los espermatozoides (Blondin *et al* 2009).

Como consecuencia del proceso de separación de espermatozoides portadores del cromosoma X o Y mediante citometría de flujo, la muestra seminal sexada muestra una marcada reducción de la motilidad post-descongelado y en la vida media de los espermatozoides (Blondin *et al* 2009, Schenk *et al* 1999b, Seidel 2007). Esto se debe a fuerzas de presión para su avance dentro del citómetro de flujo, efecto dilución, congelamiento y posterior descongelamiento, que provocan una serie de injurias acumuladas que afectan o comprometen las funciones espermáticas esenciales y su capacidad

fecundante (Garner 2001, 2006, Gosálvez *et al* 2011a, b, Rath *et al* 2013, Seidel 2012). También fue sugerido que el proceso de sexado induciría reacciones precapacitantes generando subpoblaciones espermáticas en la muestra con estados de capacitación diferentes (Blondin *et al* 2009). Esto explicaría la necesidad de ajustar la concentración de factores capacitantes en el medio de fertilización *in vitro* de acuerdo al toro o muestra utilizada (Lu and Seidel 2004).

El agregado de ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) aumentaría el contenido de colesterol del espermatozoide manteniéndose elevado aún luego de someterlos a un proceso de congelado y descongelado (Amorim *et al* 2009, Moce *et al* 2010a, Purdy and Graham 2004b). El tratamiento con CLC a los espermatozoides, previo a la congelación, ha demostrado mejorar la motilidad y viabilidad no sólo inmediatamente luego de post-descongelado sino también a lo largo del tiempo (Moce *et al* 2010b), aumentar el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida (ZP) y porcentaje de penetración en ovocitos (Moore *et al* 2005, Purdy and Graham 2004a, Spizziri *et al* 2010) e incrementar la producción de embriones *in vitro* (Lee *et al* 2015).

El objetivo de este trabajo es estabilizar las membranas plasmáticas de espermatozoides sexados mediante el agregado de CLC post-descongelado y consecuentemente, prolongar su funcionalidad, aumentar su capacidad de fecundar ovocitos *in vitro* y producción de embriones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los químicos utilizados en este estudio se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) a menos que se indique lo contrario.

SEMEN SEXADO

Dosis de semen sexado congelado de tres toros fueron adquiridas de un proveedor comercial (Genex Cooperative, Inc., Shawano, WI, USA). Las dosis de semen de cada toro provienen del mismo lote/partida.

DESCONGELACIÓN DEL SEMEN Y PROCESAMIENTO

Las dosis de semen sexado se descongelaron a 37° durante 45 segundos. Las dosis se secaron individualmente, el extremo sellado se cortó con un dispositivo aséptico y el contenido fue expulsado en un tubo de 1,5 ml pre-calentado a 37°C. El contenido de la dosis se mezcló bien e inmediatamente se procedió a mejorar el semen mediante un gradiente de densidad: 40%/80% (PureSperm, Spectrum Technologies, Healdsburg, CA, USA). La centrifugación se realizó a 700 g durante 15 minutos. Luego se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en TALP-Sperm (pH= 7.4, 295 mOsm) (Parrish *et al* 1985, Parrish *et al* 1986) y se centrifugó nuevamente el tubo a 300 g por 5 minutos. La formulación final del TALP-Sperm fue: 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0,3 mM NaH₂PO₄, 0,4 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 21,6 mM ácido láctico, 25 µg/mL gentamicina, y 6 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA).

El pellet resultante de la segunda centrifugación fue resuspendido pipeteando suavemente en 100 µl de

medio sintético oviductal modificado SOF-FERT (Ter-vit *et al* 1972) e incubado a 38,5°C y 5% CO₂ en aire con humedad en saturación. La formulación final del SOF-FERT consistió en: 107,7 mM NaCl, 7,16 mM KCl, 1,19 mM KH₂PO₄, 0,49 mM MgCl₂, 1,17 mM CaCl₂, 5,3 mM lactato de sodio, 25,07 mM NaHCO₃, 0,20 mM piruvato de sodio, 0,5 mM fructosa, 5 µg/mL gentamicina, 20 µg/mL heparina, penicilamina (3 µg/mL), hipotaurina (11 µg/mL) y 6 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA).

ANÁLISIS DE SEMEN COMPUTARIZADO (CASA)

La muestra de semen de cada toro fue analizada mediante un sistema CASA (SpermVision®, Minitube, Alemania). La programación del CASA fue la siguiente: cuadros por segundo = 60, número de cuadros = 30; contraste mínimo = 50, tamaño mínimo de la célula = 5; tamaño de la célula = 5, intensidad de la célula = 50; velocidad de trayectoria = 50 µm/s, rectitud ≥70%, células lentas (µm/s); velocidad media (VAP, <30 µm/s) y velocidad rectilínea (VSL, <15 µm/s). Las variables a medir con el sistema CASA fueron: porcentaje de motilidad total (MOT), porcentaje de motilidad progresiva (PMOT), VAP, VSL, velocidad curvilínea (VCL, µm/s), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm), frecuencia de cruce (BCF, Hz), índice de rectitud (STR, %), índice de linealidad (LIN, %) e índice de oscilación (WOB, %). La temperatura de la cámara del CASA será de 37°C. Se utilizó una cámara de 4 celdas Leja (IMV International Corp., Maple Grove, MN, USA) atemperada a 37°C para cargar la muestra de semen de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Teniendo en cuenta que los espermatozoides fueron teñidos previamente con Hoechst 33342 durante el proceso de sexado, se utilizó la óptica fluorescente IDENT del CASA. El número promedio de espermatozoides analizados por tratamiento fue de 344 ± 78 espermatozoides.

PREPARACIÓN DE CLC

La preparación de la CLC se realizó de acuerdo a una publicación pre-existente (Purdy and Graham 2004b). Inicialmente, se diluyó 1 g de metil-β-ciclodextrina en 2 ml de metanol y 200 mg de colesterol en 1 ml de cloroformo. El stock colesterol se diluyó con metil-β-ciclodextrina hasta obtener una solución clara. Los disolventes fueron removidos mediante la incubación a 50°C durante 24 horas y los cristales formados fueron almacenados a temperatura ambiente. Momentos antes de su uso (30 min), 10 mg de CLC fueron diluidos en 1 ml de medio SOF-FERT e incubado en una incubadora a 38,5°C con un ambiente de 5% CO₂ y humedad en saturación. El tiempo de co-incubación del CLC y los espermatozoides sexados fue de 15 minutos antes de realizar el estudio CASA.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Se realizó una dilución 1:20 de la muestra de semen sexado con agua destilada (5 µl de semen + 95 µl de agua destilada) en un micro-tubo. Luego de la homogeneización por pipeteo manual se procedió a preparar la cámara de Neubauer. Cada hemi-cámara fue llenada con 10 µl de la dilución. Luego de 5 minutos de reposo se realizó el recuento mediante un microscopio a 400X. Se realizó el conteo de todos los espermatozoides del

cuadrante central. El promedio de ambas cámaras fue multiplicado por 10000 y por x 20 (factor de dilución). El producto resultante es la cantidad de células espermáticas por ml.

DISEÑO EXPERIMENTAL

AGREGADO DE CLC A LA MUESTRA, EVALUACIÓN CON CASA Y FERTILIZACIÓN IN VITRO

La muestra de semen sexado fue inicialmente dividida en cuatro y aleatoriamente se le asignó una concentración de CLC (0 mg de CLC= Control; 1,5 mg de CLC; 3 mg de CLC y 6 mg de CLC cada 120 millones de espermatozoides, respectivamente). Luego del agregado de CLC a cada grupo, la muestra tratada se incubó a 38,5°C con un ambiente de 5% CO₂ y humedad en saturación durante 15 minutos. El análisis con CASA comenzó inmediatamente después (tiempo 0), repitiéndose la evaluación a las 2, 4 y 8 hs. Las condiciones de incubación se mantuvieron constantes durante todo el período de muestreo. Se realizaron 3 repeticiones de cada nivel de CLC con cada uno de los cuatro toros.

Luego del análisis con CASA se procedió a la evaluación del semen sexado tratado con CLC en fertilización *in vitro* (FIV). El procedimiento de FIV fue el siguiente. Ovarios de matadero fueron transportados en un termo con solución fisiológica y antibióticos a 30-32°C. Los folículos entre 2-6 mm de diámetro fueron aspirados y los complejos cúmulus-ovocito (COCs) compactos y cubiertos de manera completa por varias capas de células del cúmulus fueron seleccionados, lavados y madurados en grupos de 50 COCs en 400 µl de M199 suplementado con ALA-glutamina (0.1 mM), piruvato sódico (0.2 mM), gentamicina (5 µg/ml), EGF (50 ng/ml), oFSH (50 ng/ml), bLH (3 µg/ml), cisteamina (0.1 mM), y 10% suero fetal bovino (FBS) por 22-24 horas. La fertilización (Día 0) se llevó a cabo con semen sexado tratado con CLC (0 mg, 3 mg y 6 mg) previamente mejorado por un gradiente de densidad. La dosis inseminante fue de 1 x 10⁶. El medio de fertilización fue SOF-FERT suplementado con fructosa (90 µg/ml), penicilamina (3 µg/ml), hipotaurina (11 µg/ml) y heparina (20 µg/ml). Luego de 18 horas, los presuntos cigotos fueron denudados y cultivados en grupos de 15-20 en gotas de 50 µl SOF-BSA (Holm *et al* 1999) por 7 días. En el día 3,5 se agregó 3% de FBS. Las condiciones de incubación fueron de 38,5°C en un ambiente con 5% CO₂ y alta humedad durante la maduración, fertilización y cultivo. Además, durante el cultivo se utilizó baja tensión de oxígeno (5%). En el día 2 de cultivo se evaluó el clivaje mientras que en el día 5,5 se evaluó la presencia de mórulas (MOR) y blastocistos tempranos (eBL). En el día 7 de cultivo se realizó el registro de blastocistos (BL) y blastocistos expandidos (BLEx) y en el día 9 la tasa de eclosión de la zona pelúcida. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando InfoStat version 2015 (Di Rienzo *et al* 2015) en conjunto con lenguaje R versión 3.2.3 (R Development Core Team 2015). Para considerar la totalidad del modelo experimental y las restricciones en la aleatoriza-

Tabla I. Efecto de distintas concentraciones de CLC sobre la motilidad espermática (Effect of different concentrations of CLC on sperm motility).

CASA	CLC (mg)			
	0	1,5	3	6
MOT (%)	13,42±1,46 ^A	13,17±1,41 ^A	17,00±2,17 ^B	10,64±1,00 ^A
PMOT (%)	11,58±1,61 ^{AB}	8,87±1,08 ^A	14,75±2,35 ^B	8,84±1,07 ^A
VAP (µm/s)	30±1,78 ^A	51,76±3,61 ^B	47,77±3,2 ^B	27,06±1,58 ^A
VSL (µm/s)	26,13±1,79 ^A	47,06±4,27 ^B	43,52±3,76 ^B	23,57±1,58 ^A
VCL (µm/s)	54,38±3,77 ^A	93,89±7,72 ^C	78,15±5,91 ^B	56,56±3,94 ^A
LIN (%)	48,27±4,50 ^B	49,33±4,69 ^B	55,61±5,92 ^C	43,27±3,65 ^A
STR (%)	75,46±1,40 ^A	86,49±1,82 ^{BC}	88,25±1,82 ^B	77,04±1,45 ^A
WOB (%)	55,45±4,04 ^B	54,43±3,90 ^B	61,20±4,87 ^C	49,28±3,24 ^A
ALH (µm)	1,39±0,11 ^A	2,57±0,27 ^B	2,53±0,27 ^B	1,77±0,16 ^{AC}
BCF (Hz)	16,46±1,19	16,46±1,19	16,46±1,19	16,46±1,19

ción, los datos fueron analizados utilizando modelos generalizados mixtos independientes para cada variable de respuesta (y), utilizando una distribución Gamma de parámetros κ y λ (1), predictor lineal η_{ijk} (2) y función de enlace canónico $g(\mu)=\mu^{-1}$ (3):

$$\begin{aligned}
 y &\sim \Gamma(\kappa, \lambda) & (1) \\
 \eta_{ijk} &= \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_i + \alpha_i \times \gamma_i + \beta_j \times \gamma_j + b_k & (2) \\
 g(\mu) &= 1/\mu = \eta_{ijk} & (3)
 \end{aligned}$$

donde la variable y (MOT, PMOT, VSL, VCL, WOB, LIN, STR, VAP, BCF y ALH) se modela a través de un predictor lineal (η_{ijk}) en la que los efectos fijos se encuentran dados por la contribución de una media global (μ), el i -ésimo efecto de tiempo lineal ($\alpha_i=0, 2, 4$ y 8 horas) o cuadrático ($\beta_i=\alpha_i^2$), la j -ésima concentración de CLC (γ_j) y las correspondientes interacciones dobles de tiempo por CLC ($\alpha_i \times \gamma_j$ y $\beta_i \times \gamma_j$), mientras que el único efecto aleatorio considera un intercepto para el k -ésimo efecto de toro $b_k \sim N(0, I\sigma_b^2)$, i. e., distribuido normal con media cero y varianza dada por la matriz identidad (I) multiplicada por el mismo parámetro σ_b^2 . Se utilizó un nivel de significancia estadística de 0,05 para analizar los coeficientes del modelo. Para evaluar la diferencia entre los tratamientos de CLC se utilizó la prueba de menor diferencia significativa de Fisher (Fisher's Least Significant Difference) donde los p -valores fueron corregidos por Bonferroni. Los porcentajes de clivaje, producción de embriones y eclosión se analizaron mediante Chi-cuadrado de Pearson.

RESULTADOS

Los datos ajustados por el modelo con sus errores estándar para cada una de las variables analizadas en función de la concentración de CLC se muestran en la **Tabla I**. Se encontraron diferencias significativas ($P<0,05$) en MOT, PMOT, LIN y WOB para los espermatozoides sexados tratados con 3 mg de CLC. Para el resto de las variables (VAP, VSL, VCL, STR y ALH) la concentración de 1,5 y 3 mg de CLC resultaron significativamente superiores a 6 mg de CLC y al grupo control. La totalidad de los valores obtenidos para las diferentes variables de CASA a diferentes tiempos y concentraciones de CLC se presentan en la **Tabla Suplementaria I**.

Los valores de la tabla se expresan como medias \pm error estándar ajustados por el modelo correspondiente a cada variable de CASA. Resultados del test de la mínima diferencia significativa de Fisher son presentados como letras superíndice. Proporciones con diferente letras a lo largo de cada fila difieren significativamente (ajustado por Bonferroni $P<0,05$). Note que para la variable BCF, no resultó estadísticamente significativo el efecto de concentración de CLC. Los valores esperados para las diferentes concentraciones de CLC han sido calculados considerando todos los tiempos de estudio (0, 2, 4, 6 y 8 hrs.).

La motilidad disminuyó significativamente en relación al tiempo (**Figura 1A**). Cabe destacar que la concentración control (CLC= 0 mg) e incluso la de 1,5 mg de CLC presentan exactamente la misma evolución temporal en relación la variable de motilidad espermática (MOT). No obstante, la concentración de 3 mg de CLC produce una reducción en la tasa de caída e incluso tiende a compensarse luego de 4 horas. Por el contrario, si se incrementa la concentración a 6 mg de CLC, el efecto benéfico del CLC se torna contraproducente ya que presenta un desempeño inferior en comparación al control.

El resto de las variables CASA mostraron un comportamiento no lineal decreciente similar al mostrado para MOT en el **Figura 1A**, a excepción de LIN donde el comportamiento en la escala original alcanza un máximo para 4 horas (**Figura 1B**). El tratamiento de 3 mg de CLC siempre presentó un intercepto no menor que el resto de las concentraciones y un mayor desempeño para todas las variables a excepción de VSL a 1,5 mg de CLC. Por otra parte, BCL presentó el mismo comportamiento independientemente de la concentración de CLC aplicada.

El clivaje de los cigotos fecundados con semen sexado tratado con CLC no mostro diferencias en 2 células a las 48 hrs. post-fertilización, mientras que si se registraron diferencias significativas en 4-8 células entre 3 y 6 mg de CLC respecto al control (**Tabla II**). El clivaje total mostró diferencias significativas a favor de 3 mg de CLC. El desarrollo embrionario posterior estuvo también marcado por una mayor velocidad de formación de MOR/eBL a favor de los espermatozoides tratados con CLC en comparación grupo control. En los estadios embrionarios avanzados, el grupo 3 mg de CLC mostró el mejor desempeño en producción de BL y embriones

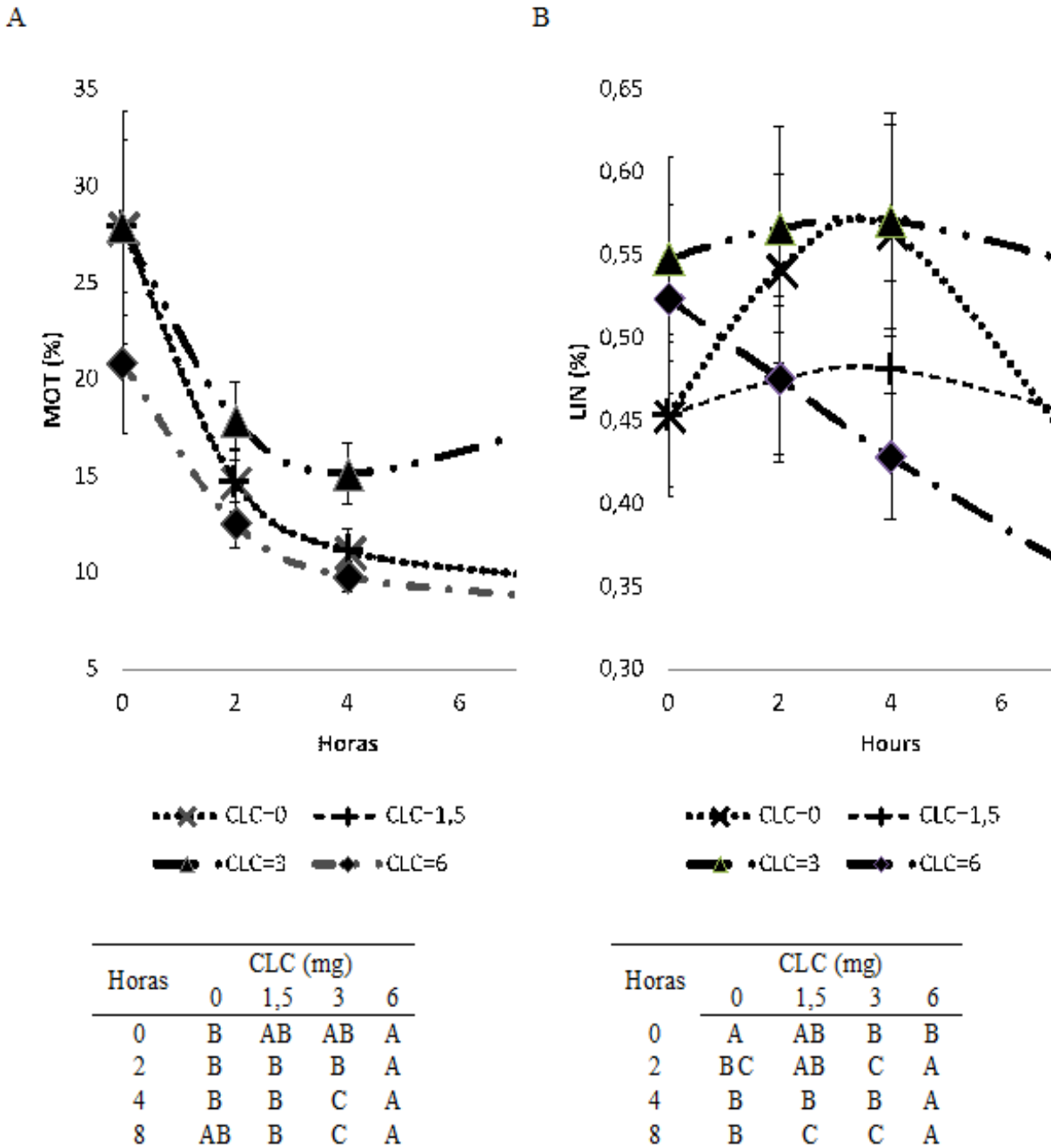


Figura 1. Motilidad del semen sexado tratado con CLC a lo largo de tiempo. A) Motilidad (MOT). B) Motilidad Lineal (LIN). Las barras muestran el error estándar de la estimación y cada tabla muestra el resultado del LSD de Fisher (en letras A, B y C) para las diferentes concentraciones de CLC, para una hora fija, con corrección de Bonferroni con ($\alpha = 0,05$) (Motility of semen sexing treated with CLC over time. Motility (MOT). Linear motility (LIN). The bars show the standard error of the estimation and each table shows the result of the Fisher LSD (in letters A, B and C) for the different concentrations of CLC, for a fixed time, with the correction of Bonferroni with ($\alpha = 0.05$)).

totales. La eclosión de los blastocistos no mostro diferencia entre los tratamientos.

DISCUSIÓN

Durante el proceso de congelamiento/descongelado del semen, los espermatozoides son sometidos a procesos con cambios drásticos de condiciones internas y externas que pueden ejercer un acción perjudicial

sobre el espermatozoide y causarle un daño temporal o permanente sobre su integridad y/o funcionalidad (Barbas and Mascarenhas 2009, Foote 2003a, Justice and Christensen 2013, Pegg 2015). Estas injurias sobre el espermatozoide podrían afectar su capacidad fecundante (Foote 2003b, Graham and Moce 2005). Una de las estructuras más afectada por el descenso de temperatura y los cambios osmóticos que se producen durante el proceso de congelación es la membrana plasmática. Los

Tabla II. Fertilización y producción *in vitro* de embriones con semen sexado tratado con CLC (*In vitro* fertilization and production of embryos with sexing semen treated with CLC).

CLC	Ovocitos (n)	Clivaje (Día 2)		Embriones					Eclosión
		2 C (%)	4-8 C (%)	Total (%)	Día 5,5		Día 7		Día 9
					MOR/eBL (%)	BL (%)	BLEx (%)	Total (%)	Total (%)
0 mg CLC	345	152 (44%)	72 (21%) ^A	224 (65%) ^A	117 (34%) ^A	85 (25%) ^{AB}	23 (7%)	108 (31%) ^{AB}	68 (63%)
3 mg CLC	370	179 (48%)	102 (28%) ^B	281 (76%) ^B	172 (46%) ^B	103 (28%) ^A	35 (9%)	138 (37%) ^A	98 (71%)
6 mg CLC	364	155 (43%)	88 (24%) ^{AB}	243 (67%) ^A	152 (42%) ^B	78 (21%) ^B	22 (6%)	100 (27%) ^B	61 (61%)

C= Células

MOR= Morula

eBL= Blastocisto temprano

BL= Blastocisto

BLEx= Blastocisto expandido

Valores con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente (P<0,05).

cambios de organización lipídica que sufre la membrana son dependientes de la temperatura y se producen por la transición de fase líquida a gel de los fosfolípidos que la componen. El colesterol juega un papel muy importante en la regulación de estos fenómenos debido a que interactúa con los fosfolípidos alterando su comportamiento de cambio de fase (Parks and Graham 1992, Watson 2000). El proceso de sexado puede provocar efectos colaterales que también podrían afectar la viabilidad de los espermatozoides (Seidel and Garner 2002). Los espermatozoides sexados muestran una marcada reducción de la motilidad post-descongelado y un acortamiento en su vida media (Schenk *et al* 1999b). Esto se debe a fuerzas de presión para lograr su avance dentro del citómetro de flujo, efecto dilución, congelamiento y posterior descongelamiento, que provocan una serie de insultos acumulados que afectan o comprometen las funciones espermáticas esenciales y la capacidad fecundante (Garner 2001, 2006, Maxwell *et al* 2004). Los trabajos publicados muestran que el semen sexado produce resultados más bajos cuando lo comparamos con su homólogo no sexado (Blondin *et al* 2009, Lu *et al* 1999, Maxwell *et al* 2004, Wheeler *et al* 2006, Wilson *et al* 2005, Xu *et al* 2009, Zhang *et al* 2003). El mayor obstáculo para el semen sexado es la baja fertilidad (Amann 1999, Garner and Seidel Jr 2003, Seidel 2012, Suh *et al* 2005). Esta situación no pudo ni siquiera revertirse aumentando el número de espermatozoides (Dejarnette *et al* 2011, Dejarnette *et al* 2010). Las posibles causas de esta disminuida fertilidad serían una menor sobrevivencia post-descongelación, motilidad espermática, pre-capacitación e integridad acrosómica (Cran 2007, Frijters *et al* 2009, Gosálvez *et al* 2011a, b, Hollinshead *et al* 2003, Rath *et al* 2008, Schenk and Seidel 2007, Seidel 2007, Suh and Schenk 2003, Suh *et al* 2005). Se ha demostrado en varios estudios en otras especies que el tratamiento de los espermatozoides con CLC previo a la congelación mejora el porcentaje de espermatozoides que sobreviven al proceso en equinos (Combes *et al* 2000, Moore *et al* 2005, Zahn *et al* 2002), en bovinos (Moce and Graham 2006, Purdy and Graham 2004a), en ovinos (Moce *et al* 2010b) y caprinos (Konyali *et al* 2013). En algunas especies, el éxito en la adición de CLC depende de la temperatura y tiempo de incubación (Álvarez *et al* 2006). En el bovino, la temperatura de incubación (37°C o 22°C) no afecta el

efecto beneficioso del CLC y alargar la incubación de los espermatozoides con CLC más allá de los 15 minutos tampoco supera los resultados (Purdy and Graham 2004b). Estas diferencias encontradas entre especies pueden ser consecuencia de la mala elección del tipo de ciclodextrina, de una concentración de ciclodextrina inadecuada o puede que sean necesarios un periodo de incubación más largo o una temperatura de incubación más alta. Nuestros resultados muestran que la incubación de espermatozoides sexados con CLC mantiene la motilidad, motilidad progresiva y vigor durante un tiempo prolongado y que la capacidad fecundante de éstos espermatozoides es mayor que los no tratados. Estas observaciones son coincidentes con publicaciones realizadas con semen convencional las cuales muestran un aumento significativo de la motilidad, capacidad fecundante medida como la facultad de mantener la integridad acrosomal y desempeño en producción de embriones *in vitro* (Amorim *et al* 2009, Li *et al* 2006, Moce *et al* 2010a, Moce and Graham 2006, Moraes *et al* 2010, Purdy and Graham 2004a, Purdy and Graham 2004b). La eficiencia en la transferencia de colesterol de las ciclodextrinas depende, entre otros factores, de la duración de la exposición de la célula al complejo ciclodextrina-colesterol (Zidovetzki and Levitan 2007). El tiempo de incubación de 15 minutos con las CLC parecería ser suficiente si bien cabe remarcar que en el protocolo original, la adición e incubación de los espermatozoides con CLC se realiza antes de la congelación y los espermatozoides no experimentan el proceso de sexado. La concentración mayor de CLC utilizada en este estudio parecería causar daño y/o toxicidad ya que afectó los patrones de motilidad y producción de embriones *in vitro*. Cuando el contenido de colesterol es excesivo y aumenta por encima del nivel normal, éste se convierte en perjudicial para la supervivencia celular afectando la fluidez de membrana y su funcionalidad (Moce *et al* 2010a, Purdy and Graham 2004a, Purdy and Graham 2004b). La concentración óptima fue el tratamiento con 3 mg de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol cada 120×10^6 espermatozoides sexados la que presentó mejores resultados en motilidad y desempeño *in vitro*. Esta cantidad de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol es similar a la utilizada en bovinos (1,5-3 mg / 120×10^6 espermatozoides) (Purdy and Graham 2004a, Purdy and Graham

2004b), en equinos (1,5 mg /120x10⁶ espermatozoides) (Moore *et al* 2005) y en caprinos (0,75-1,5 mg /120x10⁶ espermatozoides) (Barrera-Compean *et al* 2005). Los incrementos observados en los porcentajes de espermatozoides motiles fueron menores a los obtenidos en estudios realizados con semen convencional (Purdy and Graham 2004b). Tal vez se pueda aumentar y/o mantener aún más los patrones de motilidad ajustando mejor la adición de CLC mediante la determinación del contenido de colesterol en la membrana antes y después de la adición de CLC.

En conclusión, la incubación del semen sexado post-descongelado con CLC mantiene los patrones de motilidad durante más tiempo, aumenta la tasa de fecundación y producción de embriones *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhoondi M, H Oldenhof, C Stoll, H Sieme, WF Wolkers. 2011. Membrane hydraulic permeability changes during cooling of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 642-648.
- Álvarez AL, C Serres, P Torres, F Crespo, E Mateos, C Gómez-Cuéstara. 2006. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 94, 89-91.
- Amann RP. 1999. Issues affecting commercialization of sexed sperm. *Theriogenology* 52, 1441-1457.
- Amann RP, RH Hammerstedt. 1993. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of andrology* 14, 397-406.
- Amorim EA, JK Graham, B Spizziri, M Meyers, CA Torres. 2009. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 58, 210-214.
- Bailey JL, JF Bilodeau, N Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology* 21, 1-7.
- Barbas JP, RD Mascarenhas. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking* 10, 49-62.
- Barrera-Compean M, P Purdy, J Dzakuma, G Newton, L Nuti. 2005. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves post-thaw goat sperm motility. *Journal of animal science* 83, 153.
- Blondin P, M Beaulieu, V Fournier, N Morin, L Crawford, P Madan, WA King. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71, 30-38.
- Combes GB, DD Varner, F Schroeder, RC Burghardt, TL Blanchard. 2000. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of reproduction and fertility*, 127-132.
- Cormier N, MA Sirard, JL Bailey. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of andrology* 18, 461-468.
- Cran DG. 2007. XY sperm separation and use in artificial insemination and other ARTs. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 65, 475-491.
- Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of reproduction* 5, 46-52.
- Dejarnette JM, MA Leach, RL Nebel, CE Marshall, CR McCleary, JF Moreno. 2011. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *Journal of dairy science* 94, 3477-3483.
- DeJarnette JM, CR McCleary, MA Leach, JF Moreno, RL Nebel, CE Marshall. 2010. Effects of 2.1 and 3.5x10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *Journal of dairy science* 93, 4079-4085.
- Di Rienzo J, F Casanoves, M Balzarini, L Gonzalez, M Tablada, C Robledo. 2015. InfoStat v2015. In InfoStat Group, College of Agricultural Sciences, National University of Córdoba, Argentina.
- First NL, JJ Parrish. 1987. In-vitro fertilization of ruminants. *Journal of reproduction and fertility* 34, 151-165.
- Foote RH. 2003a. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci* 75, 119-139.
- Foote RH. 2003b. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci* 75, 119-139.
- Frijters ACJ, E Mullaart, RMG Roelofs, RP van Hoorne, JF Moreno, O Moreno, JS Merton. 2009. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 71, 64-67.
- Garner DL. 2001. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *Journal of andrology* 22, 519-526.
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65, 943-957.
- Garner DL, GE Seidel Jr. 2003. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science* 83, 375-384.
- Gordon I, KH Lu. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33, 77-87.
- Gosálvez J, MA Ramirez, C López-Fernández, F Crespo, KM Evans, ME Kjelland, JF Moreno. 2011a. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology* 75, 197-205.
- Gosálvez J, MA Ramirez, C López-Fernández, F Crespo, KM Evans, ME Kjelland, JF Moreno. 2011b. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. *Theriogenology* 75, 206-211.
- Graham JK, E Moce. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64, 492-504.
- Greve T, V Madison. 1991. In vitro fertilization in cattle: a review. *Reproduction, nutrition, development* 31, 147-157.
- Holm P, PJ Booth, MH Schmidt, T Greve, H Callesen. 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683-700.
- Hollinshead FK, L Gillan, JK O'Brien, G Evans, WMC Maxwell. 2003. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reproduction, Fertility and Development* 15, 351-359.
- Justice T, G Christensen. 2013. Sperm cryopreservation methods. *Methods in molecular biology* 927, 209-215.
- Kato H, A Iritani. 1993. In vitro fertilization in cattle. *Mol Reprod Dev* 36, 229-231.
- Konyali C, C Tomas, E Blanch, E Gomez, J Graham, E Moce. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* 67, 124-131.
- Kruij TA, R Boni, YA Wurth, MW Roelofsen, MC Pieterse. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42, 675-684.
- Lee YS, S Lee, SH Lee, BK Yang, CK Park. 2015. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Animal reproduction science* 159, 124-130.
- Li G, J Saenz, RA Godke, RV Devireddy. 2006. Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction* 131, 875-886.
- Loneragan P, D Rizos, F Ward, MP Boland. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction, nutrition, development* 41, 427-437.
- Looney CR, BR Lindsey, CL Gonseth, DL Johnson. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41, 67-72.
- Lu K, I Gordon, M Gallagher, H McGovern. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. *Veterinary Record* 121, 259-260.
- Lu KH, DG Cran, GE Seidel. 1999. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 52, 1393-1405.
- Lu KH, GE Seidel, Jr. 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes

- inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62, 819-830.
- Maxwell WMC, G Evans, FK Hollinshead, R Bathgate, SP de Graaf, BM Eriksson, L Gillan, KM Morton, JK O'Brien. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci* 82-83, 79-95.
- Medeiros CM, F Forell, AT Oliveira, JL Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344.
- Meyers SA. 2005. Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal reproduction science* 89, 57-64.
- Moce E, E Blanch, C Tomas, JK Graham. 2010a. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 45, 57-66.
- Moce E, JK Graham. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84, 826-833.
- Moce E, PH Purdy, JK Graham. 2010b. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal reproduction science* 118, 236-247.
- Moore AI, EL Squires, JK Graham. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51, 241-249.
- Moraes EA, JK Graham, CA Torres, M Meyers, B Spizziri. 2010. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Animal reproduction science* 118, 148-154.
- Parks J, J Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222.
- Parrish JJ, JL Susko-Parrish, NL First. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 24, 537-549.
- Parrish JJ, JL Susko-Parrish, ML Leibfried-Rutledge, ES Critser, WH Eye-stone, NL First. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.
- Pegg DE. 2015. Principles of cryopreservation. *Methods in molecular biology* 1257, 3-19.
- Pons-Rejraji H, JL Bailey, P Leclerc. 2009. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reproduction, fertility, and development* 21, 525-537.
- Purdy PH, JK Graham. 2004a. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of reproduction* 71, 522-527.
- Purdy PH, JK Graham. 2004b. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48, 36-45.
- R Development Core Team 2015. R: A language and environment for statistical computing (Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing).
- Rath D, S Barcikowski, S de Graaf, W Garrels, R Grossfeld, S Klein, W Knabe, C Knorr, W Kues, H Meyer, J Michl, G Moench-Tegeder, C Rehbock, U Taylor, S Washausen. 2013. Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction* 145, R15-R30.
- Rath D, G Moench-Tegeder, U Taylor, LA Johnson. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71, 22-29.
- Rath D, HJ Schuberth, P Coy, U Taylor. 2008. Sperm interactions from insemination to fertilization. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 43, 2-11.
- Schenk J, T Suh, D Cran, G Seidel. 1999a. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52, 1375-1391.
- Schenk JL, GE Seidel, Jr. 2007. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed spermatozoa: effects of laser intensity, staining conditions and catalase. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64, 165-177.
- Schenk JL, TK Suh, DG Cran, GE Seidel, Jr. 1999b. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52, 1375-1391.
- Seidel GE, Jr. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68, 443-446.
- Seidel GE, Jr. 2012. Sexing mammalian sperm - Where do we go from here? *The Journal of reproduction and development* 58, 505-509.
- Seidel GE, Jr., DL Garner. 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124, 733-743.
- Sieme H, H Oldenhof, WF Wolkers. 2015. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 50, 20-26.
- Silva PF, BM Gadella. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-978.
- Spizziri B, M Fox, J Brummer, E Squires, J Graham. 2010. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 118, 255-264.
- Suh T, J Schenk. 2003. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. *Theriogenology* 59, 516.
- Suh TK, JL Schenk, GE Seidel, Jr. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64, 1035-1048.
- Tervit HR, DG Whittingham, LE Rowson. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 30, 493-497.
- Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60, 481-492.
- Wheeler MB, JJ Rutledge, A Fischer-Brown, T VanEtten, S Malusky, DJ Beebe. 2006. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology* 65, 219-227.
- Wilson RD, KA Weigel, PM Fricke, JJ Rutledge, ML Leibfried-Rutledge, DL Matthews, VR Schutzkus. 2005. In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *Journal of dairy science* 88, 776-782.
- Xu J, SA Chaubal, F Du. 2009. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 71, 39-47.
- Zahn FS, FO Papa, JJA Dell'Aqua. 2002. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* 58, 237-240.
- Zhang M, KH Lu, GE Seidel. 2003. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology* 60, 1657-1663.
- Zidovetzki R, I Levitan. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 1311-1324.