

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 382**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/076 (2010.01)

A61D 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2000** **E 05001937 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013** **EP 1557087**

54 Título: **Método de crioconservación de espermatozoides seleccionados**

30 Prioridad:

24.11.1999 US 167423 P
05.01.2000 US 478299

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.02.2014

73 Titular/es:

XY, LLC (100.0%)
22575 STATE HIGHWAY 6 SOUTH
NAVASOTA, TX 77868, US

72 Inventor/es:

SCHENK, JOHN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 442 382 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de crioconservación de espermatozoides seleccionados

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método para congelar espermatozoides seleccionados por sexo.

Antecedentes de la invención

10

Más de medio siglo atrás, se introdujo la inseminación artificial en los Estados Unidos como una herramienta de cría comercial para una gran diversidad de especies de mamíferos. Aunque la inseminación artificial estuvo limitada inicialmente a regiones relativamente próximas al sitio de recolección de los espermatozoides, los avances en la crioconservación y el almacenamiento de los espermatozoides han facilitado la amplia distribución y comercialización de espermatozoides para inseminación artificial o fertilización in vitro.

15

Otras mejoras en la recolección, la selección, la crioconservación, el almacenamiento y las técnicas de manipulación de los espermatozoides de mamíferos han mejorado la capacidad de los criadores para producir animales que tengan las características deseadas. Por ejemplo, los avances en la selección de los espermatozoides de mamíferos basada en pequeñas diferencias en las características físicas ha hecho posible separar los espermatozoides según el tipo de sexo, es decir, seleccionar los espermatozoides que contienen el cromosoma X o el Y. Esta técnica permite al criador manipular el porcentaje relativo de espermatozoides tipo X o Y en una muestra y así determinar el sexo de las crías. La capacidad para seleccionar los espermatozoides basándose en el tipo de sexo o cualquier otra característica deseable proporciona una herramienta importante para acelerar el progreso genético, aumentar la eficiencia de la producción y lograr mayor flexibilidad en el manejo del ganado. La explotación total de esta herramienta, sin embargo, depende de la capacidad de congelar y almacenar los espermatozoides seleccionados.

20

25

Se dispone de varios métodos para seleccionar espermatozoides; sin embargo, la selección y el tratamiento posterior de los espermatozoides presenta desafíos únicos debido a que éstos son incapaces de reparar el ADN y a la morfología espermática. Cada espermatozoide tiene un acrosoma que cubre la cabeza y una cola, que son importantes para la fertilidad y que son relativamente propensas a sufrir daño físico. Además, la fertilidad de los espermatozoides disminuye al aumentar el tiempo entre la recolección y el uso. Como la mayoría de los métodos de selección disponibles implican estrés físico e insumen tiempo, los espermatozoides seleccionados están habitualmente un poco deteriorados en comparación con los no seleccionados. La fertilidad se puede reducir aún más si la técnica de selección implica una dilución importante. Se ha sugerido que este "efecto de dilución" se puede deber a la pérdida de componentes protectores del plasma seminal.

30

35

La citometría de flujo es un método de selección particularmente eficaz que se ha empleado para la clasificación de espermatozoides por tipo de sexo. Sin embargo, los espermatozoides clasificados están sometidos a mayor estrés que el estrés normal de los protocolos estándar de inseminación artificial o fertilización in vitro. En particular, la citometría de flujo demanda mucho tiempo y, debido a las limitaciones físicas de los citómetros de flujo, los espermatozoides se deben diluir para la clasificación hasta niveles que no son óptimos para el almacenamiento (generalmente hasta el orden de 10^5 - 10^6 /ml). Además, los espermatozoides clasificados para inseminación artificial se deben concentrar para que se puedan utilizar equipos de acondicionamiento y distribución convencionales. La necesidad de un paso de concentración expone así a los espermatozoides ya algo deteriorados a estrés físico adicional.

40

45

El congelamiento de los espermatozoides también reduce invariablemente su fertilidad, movilidad y/o viabilidad. Seidel et al (1999) Theriogenology, vol. 51, número 1, página 400 describe una técnica para la crioconservación de espermatozoides seleccionados por sexo.

50

Resumen

La presente invención proporciona un método para la crioconservación de espermatozoides bovinos seleccionados por sexo que comprende:

55

- (a) obtener una muestra de semen bovino;
 - (b) agregarle un extensor inicial y seleccionar el semen por sexo mediante citometría de flujo;
 - (c) enfriar dicha muestra de semen seleccionado;
 - (d) aislar por centrifugación los espermatozoides de dicha muestra de semen seleccionado fría para producir espermatozoides aislados fríos;
 - (e) agregar un extensor final a dichos espermatozoides aislados fríos para producir una suspensión de espermatozoides fría, en la cual el extensor final contiene un crioprotector y Tris[hidroximetil]aminometano;
- y

60

(f) congelar dicha suspensión de espermatozoides.

La presente divulgación también proporciona una muestra de espermatozoides bovinos congelados que han sido seleccionados por tipo de sexo.

La muestra de espermatozoides seleccionados congelados se puede utilizar en diversas aplicaciones. En particular, la muestra se puede descongelar y utilizar para la fertilización. Por consiguiente, la divulgación también incluye un método de uso de la muestra de espermatozoides seleccionados congelados para inseminación artificial o fertilización in vitro.

Descripción detallada de la invención

La presente invención permite la crioconservación de espermatozoides bovinos que han sido seleccionados por tipo de sexo, facilitando el almacenamiento o el envío de muestras de espermatozoides seleccionados a sitios distantes del punto de recolección. El descongelamiento produce espermatozoides viables que se pueden utilizar en procedimientos como la inseminación artificial ("IA") y la fertilización in vitro ("FIV"). Este resultado fue sorprendente debido a la fragilidad bien documentada de los espermatozoides. Investigadores anteriores habían demostrado que el estrés asociado a varios métodos de selección o a la crioconservación provocaba pérdidas significativas en la fertilidad y/o la viabilidad. Los inventores de la presente demostraron que se puede lograr la preñez con espermatozoides seleccionados y luego congelados.

La invención representa un avance importante en el manejo de ganado bovino, donde la selección de los espermatozoides para su uso en dichos procedimientos se puede utilizar para aumentar la producción de crías que tengan características deseables. La selección para obtener espermatozoides que tengan el cromosoma X o el Y permite controlar el sexo de las crías, lo cual es ventajoso para los productores de ganado lechero o de carne. La capacidad de congelar espermatozoides seleccionados, que proporciona la invención, permitirá el uso generalizado de dichos métodos de selección, por ejemplo, para aumentar la eficiencia en la producción así como en la calidad del ganado bovino.

Definiciones

El término "acrosoma" o "gorra acrosómica" se refiere a la gorra que cubre la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide y que contiene las enzimas necesarias para la penetración del óvulo.

La expresión "tipo de sexo" se refiere al tipo de cromosoma sexual presente en los espermatozoides (es decir, el cromosoma X o el Y).

El término "capacitación" se refiere a los cambios específicos que experimenta un espermatozoide para desarrollar la capacidad de fertilizar óvulos, tales como cambios enzimáticos en la superficie del acrosoma que conducen a la liberación de enzimas acrosómicas que facilitan la penetración del espermatozoide en el óvulo.

Según se usa en referencia a los espermatozoides, el término "crioprotector" se refiere a una molécula que protege a los espermatozoides durante el ciclo de congelación y descongelación, promoviendo la supervivencia y la retención de la capacidad de fertilización.

La expresión "efecto de dilución" se refiere a la rápida disminución en la movilidad y viabilidad de los espermatozoides cuando están muy diluidos.

Según se usa en este documento, el término "selección" se refiere a un método por el cual se subdivide una muestra basándose en la presencia o ausencia de una característica específica (a menos que el contexto imponga lo contrario). Por lo tanto, una "muestra de espermatozoides seleccionados" es una muestra obtenida sometiendo a selección una muestra original en función de la característica específica. Por lo tanto, una muestra de espermatozoides seleccionados está enriquecida, en relación con la muestra original, en espermatozoides que tienen la característica específica.

El término "clasificación" se usa en este documento para describir un método de selección llevado a cabo usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

El término "extensor" se refiere a cualquier medio que tienda a conservar la viabilidad espermática. El término "extensión" se refiere a la dilución de los espermatozoides con un extensor.

La expresión "extensor inicial" se refiere a un medio utilizado para extender los espermatozoides antes del paso de aislamiento del método de esta invención.

La expresión "extensor final" se refiere a un medio utilizado para extender el espermatozoides antes del paso de congelación del método de esta invención.

5 Una "sustancia orgánica" en un extensor descrito en este documento es cualquier sustancia orgánica que tienda a reducir el choque por frío y mantener la fertilidad de los espermatozoides.

Una "fuente de energía" en un extensor descrito en este documento es cualquier sustancia o sustrato que los espermatozoides puedan utilizar para el mantenimiento y/o la movilidad de las células.

10 El término "osmolalidad" según se usa en este documento, es una medida de la presión osmótica de partículas de soluto disueltas en una solución acuosa (por ejemplo, un extensor). Las partículas de soluto incluyen tanto iones como moléculas no ionizadas. La osmolalidad se expresa como la concentración de partículas osmóticamente activas (es decir, osmoles) disueltas en 1 kg de agua.

15 Obtención de una muestra de semen seleccionado

Generalmente, la muestra de semen seleccionado contiene espermatozoides viables normales. Con este fin, el eyaculado del que se obtienen los espermatozoides tiene habitualmente al menos aproximadamente 50% y preferentemente al menos aproximadamente 75% de espermatozoides morfológicamente normales. En estas realizaciones, generalmente al menos aproximadamente 40% y preferentemente al menos aproximadamente 60% de los espermatozoides en el eyaculado tienen movilidad progresiva.

25 La citometría de flujo es un método para separar células de poblaciones mixtas basado en la tinción diferencial con colorantes fluorescentes o la unión a moléculas marcadas fluorescentemente, como anticuerpos o ácidos nucleicos. En la clasificación de células activadas por fluorescencia ("FACS"), las células se "clasifican" en diferentes poblaciones basándose en la intensidad de fluorescencia en el momento de la irradiación. Se puede usar FACS para la selección por sexo de los espermatozoides debido a que el cromosoma X contiene ligeramente más ADN que el cromosoma Y. Cuando los espermatozoides se tiñen con un colorante fluorescente que se une al ADN, el espermatozoide que tiene el cromosoma X absorbe más colorante que el espermatozoide que tiene el cromosoma Y y por lo tanto las dos poblaciones se pueden separar por FACS. Esta estrategia se trató en la patente de Estados Unidos Nº 4,362,246 y se amplió significativamente en la patente de Estados Unidos Nº 5,135,759 (expedida a Johnson). La separación se mejoró mediante el uso de citómetros de flujo de alta velocidad, como el citómetro de flujo MoFlo® producido por Cytomation, Inc. (Ft. Collins, CO) y se describió en las patentes de Estados Unidos Nº 5,150,313, 5,602,039, 5,602,349 y 5,643,796, así como en la publicación PCT Nº WO 96/12171.

35 El método de selección de los espermatozoides utilizado para obtener la muestra de espermatozoides seleccionados es uno que conserva la viabilidad de los espermatozoides. Debido a la relativa fragilidad de los espermatozoides, generalmente las técnicas de citometría de flujo normales se deben modificar para clasificar los espermatozoides. Más específicamente, la citometría de flujo implica coloración, dilución e interrogación de células con luz. Todos estos pasos implican estrés que puede reducir la viabilidad de los espermatozoides. La sensibilidad de los espermatozoides a este estrés puede variar entre especies e incluso entre individuos de la misma especie. Dichas sensibilidades han sido documentadas o se pueden determinar fácilmente por estudios empíricos como los descritos en los ejemplos 1 a 5.

45 Las modificaciones que mejoran la viabilidad se describen en las publicaciones de patentes comentadas previamente. Por ejemplo, se dan a conocer procedimientos que proporcionan sistemas envolventes y colectores mejorados para la clasificación de los espermatozoides en la publicación PCT Nº WO 99/33956 (solicitud Nº PCT/US98/27909). Además, los ejemplos 1 a 7 siguientes describen procedimientos de ejemplo para la tinción y clasificación de los espermatozoides. El ejemplo 3 describe un estudio de los efectos de la intensidad del láser y la concentración de colorante en la movilidad post descongelación de espermatozoides clasificados congelados. Este estudio indica que el uso de menores intensidades de láser durante la clasificación puede aumentar la movilidad post descongelación.

55 La muestra de espermatozoides seleccionados puede contener diversos componentes además de los espermatozoides y a menudo contiene componentes añadidos para proteger a los espermatozoides durante el proceso de selección. En el uso de FACS, la muestra de espermatozoides seleccionados puede contener componentes de las soluciones utilizadas para la tinción y la clasificación (por ejemplo, el líquido envolvente y el tampón de captura).

60 Además, la muestra de espermatozoides seleccionados contiene un extensor o una fracción de extensor. Por ejemplo, son bien conocidos los extensores de "dos pasos", que incluyen una "fracción A" que carece de glicerol y una "fracción B" que contiene glicerol. En primer lugar se agrega la fracción A a los espermatozoides, seguido de la adición de un volumen igual de la fracción B. Para este paso, la fracción B a menudo se divide en al menos dos alícuotas que se agregan secuencialmente; por ejemplo, la segunda alícuota de la fracción B se agrega 15 minutos

después que la primera.

Generalmente se agrega un extensor o una fracción de extensor a la muestra de espermatozoides seleccionados antes de aislar los espermatozoides de la muestra. Si sólo están presentes algunos componentes del extensor, se pueden agregar opcionalmente componentes adicionales para que la muestra de espermatozoides seleccionados incluya un extensor completo o una fracción del extensor, antes del paso de aislamiento. En las realizaciones de ejemplo, el semen bovino se clasifica por flujo con el fin de producir una muestra de espermatozoides seleccionados que incluya la fracción A de un extensor (véanse ejemplos 2, 3 y 4). Si se desea, la fracción B se puede agregar después a la muestra de espermatozoides seleccionados antes del paso de aislamiento (véase ejemplo 5). El extensor del paso previo al aislamiento (o fracción del extensor) se denomina “el extensor inicial” para distinguirlo del “extensor final” empleado para la extensión de los espermatozoides aislados antes de la congelación. Cuando la muestra de espermatozoides seleccionados se selecciona usando FACS, el extensor inicial se puede ajustar al líquido envolvente empleado para la clasificación. Ejemplos de líquidos envolventes ajustados y extensores se describen en detalle en el ejemplo 4.

Un extensor adecuado para usar en la muestra de espermatozoides seleccionados incluye un vehículo fisiológicamente aceptable. El vehículo fisiológicamente aceptable es habitualmente acuoso y, en las realizaciones preferidas, contiene agua desionizada. Los extensores adecuados contienen habitualmente uno o más de los componentes adicionales siguientes: un crioprotector, un componente que mantiene la osmolalidad y amortigua el pH, una sustancia orgánica que evita el choque por frío y conserva la fertilidad de los espermatozoides, un detergente que actúa sinérgicamente con ciertas sustancias orgánicas para aumentar la conservación de los espermatozoides, una fuente de energía que puede ser fácilmente utilizada por los espermatozoides, un antioxidante, que protege a los espermatozoides del choque por frío, una sustancia que facilita la capacitación de los espermatozoides y uno o más antibióticos.

Aunque los crioprotectores útiles en la invención no se limitan a los que actúan por un mecanismo particular, la mayoría de los crioprotectores convencionales actúan, al menos en parte, reduciendo la deshidratación intracelular. Específicamente, la congelación es acompañada por un aumento en la concentración de soluto en el medio que rodea a los espermatozoides. Este aumento en la concentración de soluto extrae agua de las células, lo que aumenta la concentración intracelular de electrolitos. Los ejemplos de crioprotectores incluyen glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, propilenglicol y análogos.

El extensor útil en la invención incluye Tris[hidroximetil]aminometano que ayuda a mantener la osmolalidad y proporciona capacidad de amortiguación del pH. En las realizaciones preferidas de la invención, la osmolalidad del extensor se aproxima a la de los líquidos fisiológicos. Más preferentemente, la osmolalidad del extensor está en el rango de aproximadamente 280 mOsm a aproximadamente 320 mOsm. El pH también está preferentemente dentro de un rango fisiológicamente aceptable, más preferentemente en el rango de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7.5.

También se incluyen en el extensor una o más sustancias orgánicas que protegen a los espermatozoides contra el choque por frío y ayudan a conservar la capacidad de fertilización. Dichas sustancias son bien conocidas y a veces se describen como “crioprotectores no penetrantes”. Un experto en el área puede determinar fácilmente una sustancia orgánica adecuada para una aplicación particular del método de crioconservación descrito en este documento. Por ejemplo, se pueden incluir en el extensor sustancias orgánicas que contengan constituyentes protectores (por ej., lipoproteínas, fosfolípidos, lecitina) que se cree que reducen el impacto del choque por frío y el efecto de dilución. Las sustancias orgánicas adecuadas incluyen disacáridos, trisacáridos y cualquiera de sus combinaciones. Las sustancias orgánicas de ejemplo incluyen yema de huevo, un extracto de yema de huevo, leche, un extracto de leche, caseína, albúmina, lecitina, colesterol y cualquiera de sus combinaciones.

El extensor también puede incluir un detergente. Se ha informado que los detergentes alquil iónicos, como dodecilsulfato de sodio (SDS), actúan sinérgicamente con la yema de huevo para aumentar la protección contra el choque por frío. También se pueden emplear en el extensor otros detergentes útiles en la crioconservación de células, y la selección de un detergente particular para una aplicación específica forma parte de la capacidad de los expertos en el área a la luz de la guía proporcionada en este documento. Véase, por ej., el ejemplo 5.

Preferentemente, el extensor incluye una fuente de energía que sea fácilmente utilizada por los espermatozoides. En ausencia de una fuente de energía, los espermatozoides pueden oxidar los fosfolípidos intracelulares y otros componentes celulares. Por lo tanto, la inclusión de una fuente de energía en el extensor protege las reservas intracelulares y los componentes celulares. Como es bien sabido en el área, los azúcares, particularmente los monosacáridos, proporcionan una fuente de energía conveniente, aunque se puede emplear cualquier fuente de energía convencional en el extensor. Los ejemplos de monosacáridos útiles en el extensor incluyen glucosa, fructosa y/o manosa.

Opcionalmente se pueden incluir uno o más antioxidantes en el extensor para proporcionar protección adicional

contra el choque por frío. Los ejemplos de antioxidantes incluyen hidroxitolueno butilado (BHT), sus derivados y análogos. Sin embargo, también se pueden emplear en el extensor otros antioxidantes útiles en la crioconservación de células, y la selección de un antioxidante particular para una aplicación específica forma parte de las habilidades de los expertos en el área a la luz de la guía proporcionada en este documento.

El extensor también puede contener una sustancia que facilite la capacitación de los espermatozoides. En el área se conocen diversos facilitadores de la capacitación y se puede emplear cualquiera en el extensor. Los ejemplos incluyen enzimas como alfa amilasa, beta amilasa, beta glucuronidasa, que se pueden utilizar en combinación, si se desea.

Finalmente, el extensor incluye preferentemente un antibiótico puesto que una proliferación bacteriana importante puede amenazar la viabilidad de los espermatozoides y aumentar el riesgo de infección del huésped en los procedimientos de inseminación artificial o fertilización in vitro. También se puede emplear en el extensor cualquiera de una serie de antibióticos útiles en la crioconservación de células. La selección de un antibiótico adecuado depende de la especie de la cual se obtuvieron los espermatozoides, de los procedimientos implicados en la obtención y la manipulación de la muestra de espermatozoides y del o los microorganismos destinatarios específicos. Los ejemplos de antibióticos incluyen tilosina, gentamicina, lincomicina, espectinomina, linco-espectina (una combinación de lincomicina y espectinomina), penicilina, estreptomina y ticarcilina, que se pueden utilizar solos o en combinación. Sin embargo, un experto en el área puede determinar fácilmente otros antibióticos adecuados para usar en el extensor.

Los ejemplos de extensores se tratan en mayor detalle más adelante y en los ejemplos.

La concentración de espermatozoides es generalmente inferior en las muestras de espermatozoides seleccionados que en la muestra original y, como se indicó antes, con FACS, la dilución es significativa. Una clasificación típica basada en el tipo de sexo puede producir una muestra que contenga espermatozoides en una concentración de 6×10^5 células/ml de tampón de captura. Como una concentración tan baja no es óptima para el almacenamiento, el método de crioconservación de la invención generalmente concentra la muestra de espermatozoides seleccionados.

Enfriamiento de la muestra de semen seleccionado

Un paso en el método de crioconservación implica el enfriamiento de la muestra de semen seleccionado, normalmente reduciendo la temperatura a una velocidad controlada. Enfriar demasiado rápidamente puede causar un choque por frío que produce la pérdida de la integridad de la membrana y de la función celular. La gravedad de los efectos del choque por frío varía de una especie a otra y depende de factores tales como la velocidad de enfriamiento y el intervalo de temperatura. En condiciones de enfriamiento controlado adecuadas, los espermatozoides son capaces de adaptarse a los efectos térmicos. El ejemplo 2, entre otros, describe condiciones para el enfriamiento de semen bovino.

En una realización preferida de la invención, la muestra de semen seleccionado se enfría normalmente desde aproximadamente 22 °C hasta aproximadamente 5 °C, y generalmente el enfriamiento se lleva a cabo en un período entre aproximadamente 60 minutos y aproximadamente 24 horas, preferentemente en un período entre aproximadamente 90 minutos y aproximadamente 240 minutos, y muy preferentemente en un período entre aproximadamente 90 minutos y aproximadamente 120 minutos. El enfriamiento se puede llevar a cabo por cualquier método conveniente como simplemente colocar la muestra de semen seleccionado en un ambiente a 5 °C.

Aislamiento de espermatozoides de la muestra de semen seleccionado

Después de la extensión inicial de la muestra de semen seleccionado, se aíslan los espermatozoides de la muestra usando cualquier método de aislamiento suficientemente suave que proporcione al menos aproximadamente 50% de recuperación de espermatozoides, más preferentemente entre aproximadamente 75% y aproximadamente 90% de recuperación de espermatozoides, y muy preferentemente entre aproximadamente 80% y aproximadamente 90% de recuperación de espermatozoides. Durante el paso de aislamiento, el semen enfriado se debe mantener generalmente frío es decir entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8 °C, y preferentemente próximo a los 4 o 5 °C.

La centrifugación se usa para aislar los espermatozoides. En una realización de ejemplo preferida, la muestra de semen seleccionado se divide en alícuotas en tubos de 50 ml en volúmenes que no exceden de aproximadamente 27 ml, y preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 27 ml. La centrifugación se lleva a cabo a aproximadamente 4 °C, a alrededor de 850 x g, durante unos 20 minutos. Preferentemente, el paso de centrifugación proporciona al menos entre aproximadamente 50% y aproximadamente 90% de recuperación de espermatozoides, más preferentemente entre aproximadamente 60% y aproximadamente 90% de recuperación de espermatozoides, y muy preferentemente entre aproximadamente 70% y aproximadamente 90% de recuperación de espermatozoides. Después del aislamiento, se retira el sobrenadante y el sedimento se suspende por agitación en

vórtice suave o aspiración repetida a 4 °C. Después generalmente se determina la concentración de espermatozoides (por ejemplo, usando un hemacitómetro).

Extensión final de los espermatozoides aislados

Luego del aislamiento, los espermatozoides se agrupan, si se desea, y se extienden con un extensor final hasta una concentración adecuada para la congelación. La concentración de los espermatozoides luego de la extensión final y antes de la congelación está preferentemente en el rango entre aproximadamente 1×10^6 /ml y aproximadamente 300×10^6 /ml, más preferentemente entre aproximadamente 10×10^6 /ml y aproximadamente 50×10^6 /ml, y muy preferentemente entre aproximadamente 10×10^6 /ml y aproximadamente 20×10^6 /ml.

La descripción anterior del extensor inicial también se aplica al extensor final, que puede ser el mismo que el extensor inicial u otro distinto. En realizaciones particulares la composición de la muestra de espermatozoides extendidos con el extensor final es sustancialmente semejante (si no es la misma) a la composición de la muestra de espermatozoides luego de la adición del extensor inicial.

En una realización preferida de la invención se usa un extensor de yema de huevo-Tris. Después de agregar el extensor, la suspensión de espermatozoides contiene glicerol (crioprotector); ácido cítrico y Tris[hidroximetil]aminometano (tampón); yema de huevo (sustancia orgánica); fructosa (fuente de energía); tilosina, gentamicina y linco-espectina (antibióticos). Las concentraciones típicas aproximadas de estos componentes luego del agregado del extensor final a los espermatozoides aislados son:

Componentes del extensor de yema de huevo-Tris	
Glicerol:	4-8% vol/vol
Ácido cítrico:	55-75 mM
Tris[hidroximetil]aminometano:	190-210 mM
Yema de huevo:	5-25% vol/vol
Fructosa:	45-65 mM
Tilosina:	25-100 µg/ml
Gentamicina:	200-300 µg/ml
Linco-espectina:	100-400 µg/ml*
*100-400 µg/ml de lincomicina y 100-400 µg/ml de espectinomicina	

En una variante de esta realización particularmente adecuada para congelar espermatozoides bovinos, las concentraciones de estos componentes luego del agregado del extensor final a los espermatozoides aislados son: glicerol aproximadamente 6% (vol/vol), ácido cítrico aproximadamente 65 mM, Tris[hidroximetil]aminometano aproximadamente 200 mM, yema de huevo aproximadamente 20% (vol/vol), fructosa aproximadamente 56 mM, tilosina aproximadamente 50 µg/ml, gentamicina aproximadamente 250 µg/ml y linco-espectina aproximadamente 150/300 µg/ml (es decir 150 µg/ml de lincomicina y 300 µg/ml de espectinomicina), en agua desionizada.

En la referencia de Seidel et al citada antes, se emplea un extensor de yema de huevo-citrato. Después de agregar el extensor, la suspensión de espermatozoides contiene glicerol (crioprotector); citrato de sodio (tampón); yema de huevo (sustancia orgánica); tilosina, gentamicina y linco-espectina (antibióticos). Las concentraciones típicas aproximadas de estos componentes luego del agregado del extensor final a los espermatozoides aislados son:

Componentes del extensor de yema de huevo-citrato	
Glicerol:	4-8% vol/vol
Citrato de sodio:	60-80 mM
Yema de huevo:	5-25% vol/vol
Tilosina:	25-100 µg/ml
Gentamicina:	200-300 µg/ml
Linco-espectina:	100-400 µg/ml*
*100-400 µg/ml de lincomicina y 100-400 µg/ml de espectinomicina	

Las concentraciones de ejemplo preferidas para congelar espermatozoides bovinos con este extensor (que no se usa de acuerdo con la invención) son: glicerol aproximadamente 7% (vol/vol), citrato de sodio aproximadamente 72 mM, yema de huevo aproximadamente 20% (vol/vol), tilosina aproximadamente 50 µg/ml, gentamicina aproximadamente 250 µg/ml, y linco-espectina aproximadamente 250/300 µg/ml.

Como una alternativa que no es parte de la invención, se emplea un extensor de yema de huevo-TES-Tris ("EY TEST"). Después de agregar el extensor, la suspensión de espermatozoides contiene glicerol (crioprotector); yema de huevo y leche caliente, por ejemplo leche homogeneizada que contiene 1.25% de fructosa Con 10% de glicerol (sustancias orgánicas); tilosina, gentamicina y linco-espectina (antibióticos). Las concentraciones típicas aproximadas de estos componentes luego del agregado del extensor final a los espermatozoides aislados son:

Componentes del extensor de yema de huevo-TES-Tris	
Glicerol:	3-7% vol/vol
Ácido Tris[hidroximetil-metil]-2-aminoetanosulfónico:	140-170 mM
Tris[hidroximetil]aminometano:	60-80 mM
Yema de huevo:	5-25% vol/vol
Fructosa:	5-12 mM
Tilosina:	50-150 µg/ml
Gentamicina:	400-600 µg/ml
Linco-espectina:	200-700 µg/ml*
*200-700 µg/ml de lincomicina y 200-700 µg/ml de espectinomicina	

Las concentraciones de ejemplo preferidas para congelar espermatozoides bovinos con este extensor (que no es parte de la invención) son: glicerol aproximadamente 5% (vol/vol), ácido Tris[hidroximetil-metil]-2-aminoetanosulfónico aproximadamente 158 mM, Tris[hidroximetil]aminometano aproximadamente 72 mM, yema de huevo aproximadamente 20% (vol/vol), fructosa aproximadamente 8 mM, tilosina aproximadamente 100 µg/ml, gentamicina aproximadamente 500 µg/ml, y linco-espectina aproximadamente 300/600 µg/ml.

Equilibrado y congelación de los espermatozoides

La extensión de la muestra de espermatozoides produce una suspensión de espermatozoides que luego se transfiere a recipientes para su congelación. Si los espermatozoides están destinados a la fertilización, las células se separan convenientemente en dosis individuales suficientes para conseguir la fertilización. Las dosis convenientes varían entre aproximadamente 1.0×10^6 espermatozoides y aproximadamente 3.0×10^6 espermatozoides.

Se puede utilizar cualquier recipiente adecuado para la congelación como por ejemplo una ampolla, un vial y una pajilla. Los espermatozoides destinados a la inseminación artificial se congelan generalmente en pajillas (por ejemplo pajillas de 0.25 ml o 0.50 ml) diseñadas para utilizar con una pistola de inseminación. Preferentemente, se coloca un bolo de extensor dentro de la pajilla, seguido, en secuencia, por aire; espermatozoides, aire y extensor, para que los espermatozoides queden flanqueados a ambos lados por un espacio de aire, que separe los espermatozoides del bolo de extensor en cada extremo de la pajilla.

Antes de congelar, generalmente se permite que los espermatozoides se equilibren a aproximadamente 5 °C. Preferentemente, se permite que los espermatozoides se equilibren durante un período entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 18 horas, más preferentemente entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 18 horas, y muy preferentemente entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 6 horas (véase Ejemplo 2).

Luego del equilibrado, se puede emplear cualquier método de congelación corriente, siempre que la velocidad de congelación no sea demasiado alta (es decir que no exceda de aproximadamente 0.5 °C/minuto). Preferentemente, la velocidad de congelación es de aproximadamente 0.5 °C/minuto. En una realización de ejemplo preferida, los espermatozoides se colocan en vapor de nitrógeno líquido estático, y la congelación se lleva a cabo en 3 etapas distintas en un período de aproximadamente 10 minutos. En la primera etapa de congelación, los espermatozoides se enfrían desde aproximadamente 5 °C hasta aproximadamente -15 °C a una velocidad entre alrededor de 40 °C/minuto y alrededor de 65 °C/minuto. En la segunda etapa de congelación, los espermatozoides se enfrían desde aproximadamente -15 °C hasta aproximadamente -60 °C a una velocidad entre alrededor de 25 °C/minuto y alrededor de 35 °C/minuto. En la tercera etapa, los espermatozoides se sumergen en nitrógeno líquido a una temperatura de aproximadamente -100 °C.

Muestras de espermatozoides seleccionados

También está comprendido por el alcance de la divulgación un recipiente que contiene una muestra de espermatozoides congelados. El recipiente puede ser de cualquier material que no reaccione con la muestra de espermatozoides congelados y puede tener cualquier forma u otra característica que facilite el uso de la muestra para la aplicación deseada. Para las muestras destinadas a IA, por ejemplo, el recipiente es convenientemente una pajilla (por ejemplo, una pajilla de 0.25 ml o 0.5 ml) diseñada para usar con una pistola de inseminación. El recipiente se sella de manera adecuada para conservar la muestra a la temperatura de almacenamiento prevista, que es generalmente inferior a -80 °C. Las pajillas de 0.25 ml se pueden sellar, por ejemplo, con polvo de PVC, mediante ultrasonido, o con un tapón de algodón-polivinilo o una bola de acero inoxidable (BB).

Como la muestra de espermatozoides congelados de la invención habitualmente se descongela antes de usar, la divulgación también proporciona una muestra descongelada de espermatozoides seleccionados previamente congelados y un recipiente que contiene dicha muestra descongelada.

Uso de la muestra de espermatozoides seleccionados

La muestra de espermatozoides seleccionados congelados es adecuada para utilizar en cualquier método en el cual se utilicen espermatozoides. La muestra se puede descongelar y utilizar en cualquier método de fertilización convencional, como la inseminación artificial o la fertilización in vitro. La descongelación se realiza de la misma manera que para los espermatozoides sin seleccionar congelados: en resumen, la pajilla que contiene los espermatozoides congelados se sumerge en un baño de agua mantenido a una temperatura entre aproximadamente 35 °C y 37 °C durante un período de alrededor de 20 a 30 segundos. Después de descongelar, la colocación del semen (es decir, la inseminación) se realiza según los procedimientos estándar, teniendo cuidado de proteger a los espermatozoides de las fluctuaciones ambientales.

Ejemplos

Ejemplo 1

Efectos de la dilución sobre los espermatozoides

Objetivo: determinar el efecto de la concentración de los espermatozoides sobre la movilidad de los mismos para espermatozoides sin clasificar, sin congelar pero muy diluidos.

A. Efectos de la dilución sobre los espermatozoides sin lavar

1. Recolección de la muestra original. Se recolectó semen de toros según un cronograma de recolección de rutina utilizando una vagina artificial como se describe en Schenk J., Proc 17^a NAAB, p.48-58 (1998), y Saacke RG, Proc NAAB Tech Conf AI Reprod. 41:22-27 (1972). Todos los eyaculados utilizados contenían más de 50% de espermatozoides progresivamente móviles y más de 75% de espermatozoides morfológicamente normales. Se agregaron antibióticos al eyaculado sin procesar según lo descrito por Shin S., Proc NAAB Tech Conf AI Reprod. 11:33-38 (1986) en los 15 minutos siguientes a la recolección y se determinó la concentración de los espermatozoides usando un espectrofotómetro.

2. Métodos. Se diluyeron los espermatozoides de 4 toros a 1.25, 2.5, 5, 10, 15 y 20 × 10⁶/ml usando un extensor de yema de huevo-citrato (EYC) preparado con yema de huevo 20% (vol/vol) en citrato de sodio 72 mM, tilosina 50 Tg/ml, gentamicina 250 Tg/ml y linco-espectina 250/300 Tg/ml. Se preparó cada muestra por duplicado (2 tubos/dilución/toro) con un volumen total de 8 ml por tubo. Todas las muestras se incubaron durante 60 minutos a 22 °C, luego de lo cual se centrifugaron usando una centrifuga de rotor basculante (Eppendorf, Modelo N° 5810R) a 600 x g durante 10 minutos para concentrar los espermatozoides. Luego de la centrifugación, no se retiró el sobrenadante de uno de los conjuntos de tubos duplicados; los espermatozoides se resuspendieron en el mismo medio y a la concentración original mediante aspiración suave repetida usando una pipeta serológica de 5 ml. (El segundo conjunto de tubos duplicados se usó en el ejemplo 1B). Después las muestras de espermatozoides se enfriaron hasta 5 °C a 0.2 °C/minuto en 90 minutos. Estos espermatozoides se denominaron "espermatozoides sin lavar". Todas las muestras incubaron a 5 °C durante 24 o 48 h luego de la recolección.

3. Evaluación de la movilidad. Después de la incubación, las muestras se calentaron hasta 37 °C usando una incubadora de bloque en seco durante 10 minutos antes de determinar la movilidad. Para este experimento se hizo una única estimación a ciegas del porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles para cada muestra. Un único observador determinó subjetivamente la movilidad progresiva de los espermatozoides para cada subclase (microscopía con contraste de fases x200.); otra persona preparó los frotis de manera aleatoria para que el observador ignorara los tratamientos.

4. Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte) con los factores toros y concentración de la dilución inicial. Se realizaron análisis por separado para cada tiempo de incubación. Las tendencias de la dilución se analizaron usando contrastes lineales (log).

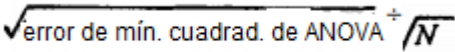
5. Resultados. Los datos para espermatozoides sin lavar (Tabla 1) revelaron relaciones lineales (log) (P<0.01) para

ambos tiempos de incubación. Los porcentajes de espermatozoides móviles aumentaron a medida que aumentó la concentración de los espermatozoides de $1.25 \times 10^6/\text{ml}$ a $10 \times 10^6/\text{ml}$, pero hubo poca diferencia después de eso. El término cúbico fue significativo ($P<0.05$) para la incubación de 24 h y marginalmente significativo ($P<0.1$) para la incubación de 48 h. Hubo un efecto del factor toro ($P<0.01$) a ambos tiempos.

5 Tabla 1. Efectos del enfriamiento sobre la movilidad de los espermatozoides sin lavar (%) después de enfriar hasta 5 °C.

Dilución ($10^6/\text{ml}$)	Incubación a 5 °C	
	24 h ^a	48 h ^b
1.25	18 ^c	0 ^c
2.5	38 ^{c,d}	6 ^{c,d}
5.0	56 ^d	31 ^{d,e}
10.0	61 ^d	42 ^e
15.0	55 ^d	44 ^e
20.0	58 ^d	41 ^e
E.E. ^f	5.6	6.4

^a Efectos lineales (log) ($P<0.01$) y cúbicos ($P<0.05$).
^b Efectos lineales (log) ($P<0.01$) y cúbicos ($P<0.1$).
^{c,d,e} Las medias dentro de las columnas sin supraíndices comunes difieren ($P<0.05$)



(SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.)

B. Efectos de la dilución sobre los espermatozoides lavados

1. Recolección de la muestra original. En este experimento se usó el segundo conjunto de tubos duplicados que contenían muestras preparadas en el ejemplo 1^a
2. Métodos. Los espermatozoides se diluyeron, se incubaron y se concentraron por centrifugación como en el ejemplo 1A. Luego de la centrifugación, se aspiraron 7.1 ml del sobrenadante de cada tubo, se eliminó la mayor parte del plasma seminal dejando los espermatozoides en un sedimento de 900 µl. Los espermatozoides se diluyeron con EYC (véase Ejemplo 1A) para preparar suspensiones de espermatozoides de $10 \times 10^6/\text{ml}$ o $20 \times 10^6/\text{ml}$. Después las muestras se enfriaron hasta 5 °C en el correr de 90 minutos como en el ejemplo 1A.
3. Evaluación de la movilidad. Las muestras se calentaron y se les evaluó la movilidad progresiva como en el ejemplo 1A.
4. Análisis estadístico. Los datos se analizaron como en el ejemplo 1A. Además, se analizaron los datos del ejemplo 1B para la concentración de incubación a 5 °C.
5. Resultados. Los datos de espermatozoides lavados (Tabla 2) no revelaron ningún efecto significativo del tratamiento cuando se evaluaron los espermatozoides después de 24 h. Sin embargo, después del almacenamiento durante 48 h a 5 °C hubo efectos de los factores toro, dilución inicial, concentración por incubación e incubación por toro ($P<0.05$). Más espermatozoides permanecieron móviles cuando se mantuvieron a una concentración de $20 \times 10^6/\text{ml}$ que a $10 \times 10^6/\text{ml}$ (31% vs. 20%; $P<0.05$). Las diluciones iniciales de 1.25, 2.5 y 5×10^6 espermatozoides/ml resultaron en menor movilidad progresiva que 10×10^6 espermatozoides/ml ($P<0.05$), con las respectivas medias del efecto principal de 19, 20, 27 y 37% de espermatozoides móviles.

Tabla 2. Efectos acumulativos del lavado, la dilución, la concentración y el enfriamiento sobre la movilidad progresiva de los espermatozoides (%)

	Almacenamiento 5 °C - Concentración de los espermatozoides y duración			
	24 h		48 ha	
Concentración de espermatozoides (10^6 /ml) durante 1 h de preincubación a 37 °C	20×10^6 /ml	10×10^6 /ml	20×10^6 /ml	10×10^6 /ml ^b
1.25	45	49	24	15
2.5	51	40	29	11
5.0	54	54	32	21
10.0	51	50	40	34
15.0	60		41	
20.0	55		40	

^a La concentración a 20×10^6 espermatozoides/ml fue superior ($P < 0.05$) a 10×10^6 espermatozoides/ml después de 48 horas de almacenamiento. 10×10^6 Asimismo, la dilución inicial a 10×10^6 fue superior a las diluciones menores ($P < 0.05$). Los errores estándar agrupados

$\sqrt{\text{error de mín. cuasad. de ANOVA} + \frac{1}{N}}$

fueron 4.0 para la incubación de 24 h, y 2.8 para la incubación de 48 h.

^bTendencia lineal (log) significativa ($P < 0.06$)

5 C. Conclusión

La alta dilución de los espermatozoides y el enfriamiento resultaron en una reducción sustancial en el porcentaje de espermatozoides móviles, independientemente de la presencia o la eliminación del plasma seminal. Sin embargo, este efecto de dilución fue atenuado en gran medida concentrando los espermatozoides diluidos a 10×10^6 /ml y aún más, a 20×10^6 /ml antes del almacenamiento a 5 °C. Los espermatozoides de algunos toros toleraron mejor la dilución que los espermatozoides de otros toros; sin embargo las diferencias encontradas entre toros son típicas. Los espermatozoides extremadamente diluidos podrían deteriorarse durante la clasificación, en parte, por la eliminación de compuestos protectores del plasma seminal.

15 Ejemplo 2

Efectos del tiempo de equilibrado antes de congelar los espermatozoides clasificados

Objetivo: evaluar el efecto de los tiempos de equilibrado (3, 6 y 18 h, 5 °C) antes de congelar los espermatozoides clasificados por flujo.

El experimento siguiente se reprodujo en su totalidad utilizando los mismos toros:

1. Recolección de la muestra original. Se recolectó el semen de 4 toros y se preparó del modo descrito en el ejemplo 1A.

25 2. Métodos.

a) Tinción y preparación para la clasificación.

30 i) Preparación de la solución madre de tinción: se preparó una solución madre 8.89 mM de Hoechst 33342 (bis-Benzimida H-33342; N° 190305, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) en agua desionizada.

35 ii) Procedimiento de tinción de los espermatozoides: los espermatozoides se diluyeron en un tampón TALP modificado (Tabla 3) a 400×10^6 espermatozoides/ml. Después de la dilución, se agregó el colorante Hoechst 33342 a las suspensiones de espermatozoides a una concentración de 224 μ M. Después de que se agregó el colorante a las suspensiones de espermatozoides, las muestras se incubaron durante 60 minutos a 34 °C. Luego de la incubación, los espermatozoides se diluyeron hasta 100×10^6 /ml con TALP que contenía yema de huevo clarificada 2.67% y colorante alimentario (FD&C N° 40) 0.002% que detiene la fluorescencia de Hoechst 33342 en los espermatozoides con membranas celulares deterioradas, lo que

permite dejarlos fuera durante el proceso de clasificación. Justo antes de clasificar por flujo, las muestras se filtraron a la gravedad de la unidad a través de un filtro de nylon de malla 40 μm para eliminar cualquier residuo o espermatozoides aglutinados.

b) Clasificación. Se utilizó un láser de argón de dos líneas operando a 351 y 364 nm y 150 mW para excitar al colorante Hoechst 33342. El citómetro de flujo/clasificador de células utilizado fue un MoFlo® SX (Cytomation, Inc., Fort Collins, CO, EE.UU.) operando a 50 psi. Se utilizó un líquido envolvente a base de Tris que consistía en Tris(hidroximetil)aminometano (Tris; 197.0 mM N° T-1503, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), ácido cítrico monohidratado (55.4 mM; N° C-7129, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y fructosa (47.5 mM; N° F-0127, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.). También se agregaron antibióticos de referencia al líquido envolvente a base de Tris que consistieron en 0.58 g/L de penicilina y 0.05 g/L de sulfato de estreptomicina. Los espermatozoides se clasificaron mediante un proceso conocido como "clasificación a granel" que permite la rápida acumulación de grandes cantidades de espermatozoides de modo que se puedan realizar ejemplos a gran escala en un plazo razonable. Los espermatozoides atravesaron el citómetro de flujo en condiciones de funcionamiento estándar excepto que todas las gotitas que contenían espermatozoides viables fueron recogidas en un solo tubo en lugar de ser clasificadas en 2 tubos basándose en características específicas (por ejemplo, clasificación por tipo de sexo). Los espermatozoides se clasificaron basándose en la viabilidad; por lo tanto, los espermatozoides que tenían las membranas plasmáticas deterioradas fueron excluidos durante la clasificación a granel.

Los espermatozoides teñidos se mantuvieron a $22 \pm 1^\circ \text{C}$ durante la clasificación. Se recolectaron los espermatozoides clasificados a granel en tubos de plástico de 50 ml que contenían 2 ml de extensor de 20% de yema de huevo-Tris preparado con yema de huevo 20% (vol/vol) en Tris 200 mM, ácido cítrico 65 mM, fructosa 56 mM, tilosina 50 Tg/ml, gentamicina 250 Tg/ml y linco-espectina 150/300 Tg/ml en agua desionizada. El extensor de yema de huevo-Tris se denominó "fracción A de Tris" para denotar la falta de glicerol en este punto del procedimiento. Se recolectaron los espermatozoides en tubos para que contuvieran 12 ml y aproximadamente 6×10^6 espermatozoides. Los espermatozoides se incubaron posteriormente a 22°C durante 1 a 3 h para simular las condiciones de una clasificación basada en el tipo de sexo.

c) Preparación para la congelación. Luego de la incubación, los espermatozoides clasificados se enfriaron a 5°C en un período de 70 minutos. Después de enfriar, se juntó el contenido de los dos tubos y se transfirió a una centrífuga de rotor basculante refrigerada, fijada a 5°C y se centrifugó a $850 \times g$ durante 20 minutos. Después de retirar el sobrenadante, el procesamiento continuó a 5°C mediante la adición de unos 150 μl de fracción A del extensor Tris a aproximadamente 150 μl de sedimento de espermatozoides para llevar la concentración de espermatozoides a aproximadamente $40 \times 10^6/\text{ml}$. Los espermatozoides de cada toro se agruparon y diluyeron inmediatamente con un volumen igual de extensor de yema de huevo-Tris que contenía 12% (v/v) de glicerol ("fracción B de Tris"). La fracción B de Tris se añadió a la suspensión de espermatozoides como 2 volúmenes iguales a intervalos de 15 minutos para ajustar la concentración final de espermatozoides a $20 \times 10^6/\text{ml}$. La concentración final de glicerol del extensor completo yema de huevo-Tris que contenía los espermatozoides fue de 6% (vol/vol).

d) Equilibrado y congelación. Después los espermatozoides extendidos se acondicionaron en pajillas de cloruro de polivinilo de 0.25 ml para ser congeladas por procedimientos de rutina en rejillas, en vapor de nitrógeno líquido estático. Se congelaron 2 pajillas de cada uno de los 4 toros después de 3, 6 y 18 h de tiempo de equilibrado total a 5°C .

3. Evaluación de la movilidad post descongelación. Después las pajillas se descongelaron en un baño de agua a 37°C durante 30 segundos. Se realizaron las estimaciones a ciegas de la movilidad progresiva después de incubar las muestras a 37°C durante 0, 1 y 2 h post descongelación. Cada uno de los dos observadores estimó la movilidad progresiva de los espermatozoides de cada una de 2 pajillas de espermatozoides. Estas cuatro estimaciones a ciegas para cada unidad experimental representan un submuestreo.

4. Análisis estadístico. Estadísticamente, las submuestras se analizaron como un subgráfico del gráfico principal de mínimos cuadrados de ANOVA para analizar los efectos de cualquier observador y de interacción observador x tratamiento. N se refiere al número de unidades experimentales, no submuestras; se calcularon los errores estándar basándose en las medias de las 4 submuestras de los errores de mínimos cuadrados de ANOVA y el número de unidades experimentales; se presentan las medias de mínimos cuadrados.

Los efectos del tratamiento se evaluaron mediante pruebas ANOVA diferentes para cada tiempo de incubación. El modelo incluyó toros como efecto aleatorio y tiempo de equilibrado y observador como efectos fijos; el subgráfico constó del término observador e interacciones relacionadas.

5. Resultados. Los tiempos de equilibrado de 3 o 6 h fueron superiores a 18 h (Tabla 4), basados en el porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles, para 0 y 1 h ($P < 0.01$) pero no 2 h de incubación post descongelación. Los efectos del factor toro fueron evidentes en los tiempos de incubación de 1 y 2 h ($P < 0.05$), pero no a 0 h. No hubo una interacción significativa ($P > 0.1$) toro por tiempo de equilibrado ni hubo un efecto significativo del observador para ninguna respuesta.

Tabla 3. Tampón TALP modificado

Ingrediente	Concentración
NaCl	95.0 mM
KCl	3.0 mM
NaHPO ₄	0.3 mM
NaHCO ₃	10.0 mM
MgCl ₂ • 6H ₂ O	0.4 mM
Piruvato de Na	2.0 mM
Glucosa	5.0 mM
Lactato de Na	25.0 mM
HEPES ^a	40.0 mM
Seroalbúmina bovina ^b	3.0 mg/ml
Sulfato de gentamicina	30.0 µg/ml
^a N° H3375, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.	
^b N° US70195, fracción V; Amersham/Life Science, Cleveland, OH, EE.UU.	

5 Tabla 4. Efecto del tiempo de equilibrado pre congelación sobre la movilidad progresiva post descongelación.

Equilibrado a 5 °C	Incubación post descongelación a 37 °C		
	0 h	1 h	2 h
3 h	41 ^a	36 ^{a,b}	16
6 h	41 ^a	37 ^a	18
18 h	35 ^b	31 ^b	12
E.E. ^c	1.5	0.8	2.0
^{a,b} Dentro de las columnas, las medias sin supraíndices comunes difieren (P<0.05), prueba HSD de Tukey.			
^c Errores estándar agrupados,			
$\sqrt{\text{error de mín. cuadrat. de ANOVA} \div N}$			

6. Conclusión. Los resultados indican que no hay diferencias en la movilidad de los espermatozoides post descongelación entre 3 y 6 horas de tiempo de equilibrado total a 5 °C, pero hubo una importante disminución en la movilidad de los espermatozoides después de 18 h de equilibrado a 5 °C antes de la congelación. El intervalo de 3 a 6 h permite agrupar 2 lotes de clasificación de 3 h consecutivos para congelar los espermatozoides sin disminuir la movilidad post descongelación.

10 Como la interacción toro por tiempo de equilibrado no fue significativa, el equilibrado de 3 a 6 h fue adecuado, con la salvedad de que se usaron sólo 4 toros. El tiempo de equilibrado óptimo para una minoría de los toros se espera que sea >6 h.

Ejemplo 3

20 Efectos de la concentración del colorante y la potencia del láser sobre los espermatozoides clasificados

Objetivo: evaluar los efectos de la concentración del colorante Hoechst 33342 en combinación con la intensidad del láser sobre los espermatozoides clasificados por flujo.

1. Recolección de la muestra original. Se recolectó el semen de 6 toros y se preparó del modo descrito en el ejemplo 1A.

25 2. Métodos.

a) Diseño experimental. Se usaron un eyaculado (2 toros) y 2 eyaculados en días diferentes (4 toros) en un diseño 2 × 2 más control.

b) Tinción y clasificación. La tinción, la preparación para la clasificación y la clasificación de los espermatozoides se lograron como se describe en el ejemplo 2 excepto que el colorante Hoechst 33342 se agregó a las suspensiones de espermatozoides a una concentración final de 149 TM o 224 TM; y los espermatozoides se clasificaron a granel con el láser operando a 100 mW o 150 mW de potencia incidente. Los espermatozoides clasificados a granel se recolectaron en tubos de plástico de 50 ml como se describe en el ejemplo 2. Se recolectaron cuatro tubos que contenían aproximadamente 15×10^6 espermatozoides totales/tubo en el correr de 1 h para cada toro. Los espermatozoides clasificados se incubaron durante 1 h a 22 °C para simular un tiempo de clasificación más prolongado.

c) Preparación para la congelación. Luego de la incubación, los espermatozoides se enfriaron como en el ejemplo 2. Después se concentraron por centrifugación a 5 °C a 850 × g durante 20 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, se agregaron 150 µl de fracción A de extensor Tris a cada sedimento de espermatozoides de 150 µl a 5 °C. Todo los sedimentos de espermatozoides se suspendieron mediante aspiración repetida suave y se agruparon los espermatozoides de cada toro. Se agregó paso a paso fracción B de Tris como se describe en el ejemplo 2. Se preparó un control sin teñir y sin clasificar para cada toro a una concentración de 20×10^6 espermatozoides/ml en extensor Tris que contenía 6% de glicerol y se enfrió hasta 5 °C mientras se preparaban los espermatozoides clasificados a granel.

d) Equilibrado y congelación. Los espermatozoides de control y clasificados se acondicionaron en pajillas de cloruro de polivinilo de 0.25 ml como se describe en el ejemplo 2, se equilibraron a 5 °C durante 3 h y después se congelaron convencionalmente.

3. Evaluación de la movilidad post descongelación. Después se congelaron las pajillas y se evaluaron como se describe en el ejemplo 2.

4. Análisis estadístico. Una descripción general de los análisis estadísticos se proporciona en el ejemplo 2. Específicamente, se evaluaron los efectos del tratamiento mediante ANOVA. El modelo incluyó la concentración del colorante, la intensidad del láser y los toros en el gráfico principal, y el observador y las interacciones relacionadas en el subgráfico. Los toros se consideraron un efecto aleatorio y los otros factores como fijos.

5. Resultados. Los efectos del factor toro fueron significativos para los porcentajes de espermatozoides progresivamente móviles inmediatamente después de la descongelación ($P < 0.1$) y después de 1 h y 2 h de incubación a 37 °C ($P < 0.05$). No hubo efecto de la concentración del colorante ni de toro por concentración de colorante sobre la movilidad de los espermatozoides a ningún tiempo de incubación. Con los toros, considerados como un efecto aleatorio, 150 mW de potencia láser dieron lugar a una menor movilidad de los espermatozoides post descongelación que 100 mW a 0 h de incubación ($P < 0.1$), pero no a otros tiempos de incubación (Tabla 5). Si los toros se consideran efectos fijos, 150 mW de potencia dieron lugar a una menor movilidad de los espermatozoides que 100 mW ($P < 0.05$) a los 3 tiempos de incubación. Hubo un efecto de toro por energía del laser ($P < 0.05$) en la movilidad de los espermatozoides a 1 h, pero no a los tiempos de incubación de 0 h o 2 h. Además, la mayor potencia del láser dio lugar a una menor movilidad de los espermatozoides que el control ($P < 0.05$) a los tiempos de incubación de 0 y 1 h (Tabla 5). Hubo un efecto significativo del observador al tiempo de incubación de 1 h, pero no a los tiempos de incubación de 0 h o 2 h. No hubo interacción observador por tratamiento ($P > 0.1$).

Tabla 5. Efectos de la intensidad del láser y la concentración del colorante sobre la movilidad post descongelación (%).

Medias del efecto principal	Incubación a 37°C		
	0 h	1 h	2 h
Control	49	44	33
Concentración del colorante			
149 µM	41	39	30
224 µM	42	39	30
Intensidad del láser			
100 mW	46	42	33
150 mW	38 ^a	35 ^b	27
E.E. ^c	2.2	1.2	1.3
^a Efecto principal significativo ($P < 0.1$) y difiere del control ($P < 0.05$)			
^b Difiere del control ($P < 0.05$)			

° Errores estándar agrupados

$$\sqrt{\text{error de mín. cuadrat. de ANOVA} \div N}$$

6. Conclusión. Los porcentajes de espermatozoides progresivamente móviles post descongelación disminuyeron por los procesos de tinción y clasificación. La mayor intensidad del láser fue más dañina que la menor intensidad del láser. No hubo efecto de la concentración del colorante sobre la movilidad de los espermatozoides post descongelación. Por lo tanto, la excitación de los espermatozoides unidos al colorante Hoechst 33342 a menores intensidades del láser es menos dañina y tefir los espermatozoides a mayor concentración de colorante no tuvo efecto perjudicial sobre la movilidad post descongelación. El daño observado fue presumiblemente al aparato de movilidad de los espermatozoides.

Ejemplo 4

Evaluación de los procedimientos de tinción preclasificación y

selección de los extensores para la crioconservación de los espermatozoides

Objetivo: (1) evaluar tres tratamientos de preclasificación para los espermatozoides ; y, (2) y evaluar las combinaciones de líquido envolvente y extensor para la crioconservación de espermatozoides clasificados por flujo.

El experimento siguiente se reprodujo en su totalidad:

1. Recolección de la muestra original. Se recolectó el semen de 4 toros y se preparó del modo descrito en el ejemplo 1A.

2. Métodos.

a) Diseño experimental. Se diseñó un experimento factorial de 3 (tratamientos preclasificación) por 3 (extensores) por 2 (líquidos envolventes) por 4 (toros) por 2 (observadores) para determinar el mejor procedimiento para mantener los espermatozoides antes de clasificar, y para evaluar tres extensores para la crioconservación de los espermatozoides clasificados.

b) Preparación de la muestra y tinción. El semen recién recolectado de cada uno de los 4 toros se trató de la manera siguiente:

(1) se diluyó hasta 400×10^6 /ml en TALP modificado (véase Ejemplo 2, Tabla 3) y se tiñó durante 1 h a 34 °C antes de la clasificación a granel ("Diluido - 0 h");

(2) se incubó puro a 22 °C durante 3 h antes de la dilución, la tinción y la clasificación ("Puro - 3 h"); o,

(3) se diluyó y se tiñó como "Diluido - 0 h" y después se incubó a 22 °C durante 3 h antes de la clasificación a granel ("Diluido - 3 h").

c) Extensores. Se compararon los extensores para congelación siguientes: EYC (véase Ejemplo 1) que contenía 7% de glicerol, yema de huevo-Tris (véase Ejemplo 2) que contenía 6% de glicerol, y yema de huevo-TES-Tris (TEST) que contenía 5% de glicerol. "Fracción A" de EYC se refiere al extensor EYC que no contiene glicerol y "Fracción B" de EYC se refiere al extensor EYC que contiene dos veces la concentración final deseada de glicerol, (es decir, 14%). Así, cuando las fracciones A y B de EYC se combinan en igual volumen, el extensor EYC final contiene 7% de glicerol. Las fracciones A y B de Tris se denominan similarmente y se describen en el ejemplo 2. El extensor TEST se prepara como un extensor completo que contiene 5% de glicerol; por lo tanto no hay fracciones "A" y "B" para TEST.

d) Líquido envolvente. El líquido envolvente fue citrato de sodio dihidratado 98.6 mM (Nº S279-3, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) o Tris como se describe en el ejemplo 2. Ambos tipos de líquido envolvente se ajustaron a pH 6.8; la osmolalidad fue de alrededor de 270 a 280 mOsm/kg. Se usó líquido envolvente Tris para recolectar los espermatozoides que después se extendieron en extensores para congelación de yema de huevo-Tris y TEST. Se usó líquido envolvente que contenía citrato de sodio dihidratado 98.6 mM para recolectar los espermatozoides para luego ser extendidos en extensor para congelación EYC.

e) Clasificación. Aproximadamente 58×10^6 espermatozoides para cada combinación de tratamiento preclasificación, líquido envolvente y extensor fueron clasificados a granel como se describió en el ejemplo 2 utilizando 150 mW de potencia láser incidente. Para cada clasificación, se recolectaron los espermatozoides aproximadamente en 1 h. Después de la clasificación, las muestras se incubaron a 22 °C durante 2 h para simular una clasificación de 3 h.

f) Preparación para la congelación. Luego de la incubación, los espermatozoides se enfriaron como se describe en el ejemplo 2. Después de enfriar, las muestras se centrifugaron a 5 °C a $850 \times g$ durante 20 min. Cada muestra consistió en aproximadamente 28 ml de volumen total y estuvo contenida en un tubo de plástico de 50 ml.

Después se eliminó el sobrenadante, los espermatozoides se volvieron a colocar en una habitación fría a 5 °C para la extensión. Las muestras se extendieron hasta 40×10^6 /ml depositando 131 µl de la suspensión de espermatozoides en 69 µl de fracción A de extensor EYC, fracción A de yema de huevo-Tris o TEST. Inmediatamente, las suspensiones se ajustaron a 20×10^6 espermatozoides/ml con la adición del extensor ajustado que contenía glicerol (es decir, fracción B de EYC, fracción B de Tris) o TEST. La fracción B de los extensores se agregó a sus respectivas muestras paso a paso (2 X) a intervalos de 15 minutos como se describe en el ejemplo 2. El extensor TEST se agregó a los espermatozoides paso a paso de la misma manera que la fracción B de los extensores EYC y Tris.

g) Equilibrado y congelación. Los espermatozoides se acondicionaron en pajillas de cloruro de polivinilo de 0.25 ml, se equilibraron durante 3 h a 5 °C y después se congelaron en vapor de nitrógeno líquido estático.

3. Evaluación de la movilidad post descongelación. Las evaluaciones de los espermatozoides en la congelación y post congelación se llevaron a cabo como se describe para el ejemplo 2.

4. Análisis estadístico. Una descripción general de los análisis estadísticos se proporciona en el ejemplo 2. Específicamente, los efectos del tratamiento se evaluaron mediante análisis de varianza diferentes para cada tiempo de incubación post descongelación. El gráfico principal incluyó tratamiento preclasificación, extensores y toros; el subgráfico constó de observadores e interacciones asociadas. Los toros se consideraron un efecto aleatorio, y los otros factores, fijos. Todo el experimento se reprodujo dos veces. Se usó la prueba de HSD de Tukey para medias diferentes.

5. Resultados. La movilidad progresiva post descongelación de los espermatozoides clasificados a granel fue afectada ($P < 0.05$) por el extensor y los toros a cada tiempo de incubación post descongelación y por el procedimiento de preclasificación al tiempo de incubación de 0 h (Tabla 6). No hubo diferencias debido a los líquidos envolventes ($P > 0.05$). En la incubación de 0 h post descongelación, el uso del tratamiento Puro - 3 h resultó en más espermatozoides móviles después de la congelación y descongelación que los otros 2 tratamientos de tinción preclasificación ($P < 0.05$; Tabla 6). Sin embargo, los procedimientos preclasificación no fueron estadísticamente significativos después de la incubación post descongelación de los espermatozoides para 1 o 2 h con los toros considerados como efecto aleatorio. Es importante que, a esos 2 tiempos de incubación, hubo interacciones significativas tratamiento preclasificación por toro ($P < 0.05$). Además, el tratamiento preclasificación hubiera tenido un efecto significativo a todos los tiempos de incubación post descongelación si los toros si hubieran considerado efectos fijos.

Inmediatamente después de la descongelación (0 h), TEST fue el mejor extensor, pero después de 1 o 2 h de incubación a 37 °C, Tris fue el mejor extensor. De manera importante, no hubo interacción tratamiento preclasificación por extensor para ninguna respuesta. Hubo efectos del observador ($P < 0.01$) a todos los tiempos de incubación, pero no interacciones observador por tratamiento. No hubo una interacción toro por extensor ($P < 0.05$) a ninguno de los 3 tiempo de incubación.

Tabla 6. Efectos principales del tratamiento preclasificación y los extensores de congelación sobre la movilidad progresiva post descongelación (%)

Procedimiento preclasificación	Incubación a 37°C			
	Extensor	0 h	1 h	2 h
Diluido - 0 h	Media	39a	32	22
Puro - 3 h	Media	43 ^b	36	25
Diluido - 3 h	Media	38 ^a	31	19
Media	EYC	36 ^a	29 ^a	17 ^a
Media	Tris	40 ^b	39 ^b	29 ^b
Media	TEST	44 ^c	33 ^c	20 ^a
E.E. ^d		0.8	0.8	0.7
^{a,b,c} Las medias dentro de las columnas, en los efectos principales, sin supraíndices comunes difieren ($P < 0.05$)				
^d Errores estándar agrupados				
$\sqrt{\text{error de mín. cuadrat. de ANOVA} \div N}$				

6. Conclusión. Este estudio mostró que mantener el semen puro durante 3 h antes de la dilución, la tinción y la clasificación fue mejor que la dilución inmediata y la tinción 0 h o 3 h más tarde. Por lo tanto, a 3 h en la clasificación, es mejor continuar con una nueva alícuota del eyaculado original que se mantuvo puro 3 h y después se tiñó, en vez de continuar con la muestra original de semen teñido y mantenido a una concentración de 400×10^6

espermatozoides/ml.

Aunque el extensor TEST proporcionó mayor movilidad post descongelación a 0 h, Tris fue el mejor extensor cuando los espermatozoides estuvieron estresados por la incubación a 37 °C. Cualquiera de los líquidos envoltivos funcionó igualmente bien para cada extensor. Basándonos en estos resultados, incorporamos el uso de líquido envoltivo Tris en combinación con extensor para congelación Tris en nuestro procedimiento operativo estándar.

Ejemplo 5

10 Efectos de los aditivos de extensores sobre los espermatozoides clasificados

Objetivo: evaluar el efecto de la adición de dodecilsulfato de sodio ("SDS") al extensor para congelación sobre los espermatozoides clasificados por flujo.

15 A. Evaluación del efecto de la concentración de SDS sobre el extensor para congelación

1. Recolección de la muestra original. Se recolectó el semen de 6 toros y se preparó del modo descrito en el ejemplo 1A.

20 2. Métodos. Los espermatozoides de cada uno de los 6 toros se extendieron hasta 20×10^6 /ml en 20% de extensor de huevo entero-Tris ("WET") que contenía 0, 0.03, 0.06, 0.09 o 0.12% de SDS, se acondicionaron en pajillas y se congelaron. El extensor WET se preparó utilizando 3.028 g de Tris[hidroximetil]aminometano, 1.78 g de ácido cítrico monohidratado y 1.25 g de fructosa por 100 ml de agua bidestilada, a lo cual se le añadió 20% (vol/vol) de huevo entero. El extensor WET se preparó a un pH de aproximadamente 7.0 y con una concentración final de glicerol de alrededor del 6% (vol/vol). El extensor WET también contenía 1000 UI de penicilina sódica "G" y 100 Tg de sulfato de estreptomicina/ml.

25 3. Resultados. Las medias respectivas ($n = 1$ muestra de cada uno de los 6 toros) fueron 51, 51, 50, 51 y 48% de espermatozoides progresivamente móviles aproximadamente 10 minutos post descongelación. Basándose en estos resultados, se usó 0.06% de SDS en el ejemplo 5B.

30 B. Evaluación de los efectos de 0.06% de SDS en diversos extensores para congelación sobre la movilidad post descongelación de los espermatozoides clasificados por flujo

1. Recolección de la muestra original. Se recolectó el semen de 8 toros y se preparó del modo descrito en el ejemplo 1A.

35 2. Métodos. Se estudió la movilidad post descongelación para los espermatozoides congelados en extensores de yema de huevo-Tris (véase Ejemplo 2) y WET (véase Ejemplo 5A) con y sin 0.06% de SDS. El contenido final de glicerol para ambos extensores fue de 6%.

40 a) Tinción, preparación para la clasificación, clasificación. Se prepararon las muestras de espermatozoides de un eyaculado de cada uno de los 8 toros como se describe en el ejemplo 2. Los espermatozoides teñidos se clasificaron a granel utilizando líquido envoltivo Tris como se describe en el ejemplo 2 excepto que la clasificación se alcanzó usando 135 mW de potencia láser incidente. Los espermatozoides clasificados se recolectaron en un tubo de plástico de 50 ml que contenía 2 ml de tampón de congelación fracción A para cada extensor; se recolectaron 15×10^6 espermatozoides clasificados totales (25 ml) para cada tratamiento y se incubaron durante 1 h a 22 °C para simular una clasificación más prolongada.

45 b) Preparación para la congelación. Después los espermatozoides diluidos se enfriaron hasta 5 °C en 90 minutos. Un volumen igual de fracción B del extensor adecuado se agregó paso a paso ($\times 2$) a intervalos de 15 minutos a cada tubo de plástico de 50 ml que contenía espermatozoides clasificados. Se concentraron por centrifugación alícuotas de 25 ml/tratamiento con extensor durante 20 minutos a 850 x g en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante se retiró dejando un sedimento de espermatozoides de 600 TI, que se suspendió por agitación en vórtice suave durante 15 segundos. No se agregó ningún extensor adicional al sedimento de espermatozoides porque la suspensión que contenía el sedimento ya contenía glicerol. La concentración de la suspensión de espermatozoides fue de aproximadamente 20×10^6 espermatozoides/ml. Se preparó un control sin teñir y sin clasificar para cada toro a una concentración de 50 20×10^6 /ml en extensor de yema de huevo-Tris que contenía 6% de glicerol. El control se colocó en una habitación fría a 5 °C mientras se producía la clasificación a granel.

55 c) Equilibrado y congelación. Todos los espermatozoides de control y clasificados a granel se acondicionaron y congelaron al mismo tiempo. Los espermatozoides se acondicionaron en pajillas de cloruro de polivinilo de 0.25 ml, se equilibraron durante aproximadamente 3 h a 6 h a 5 °C, y después se congelaron en vapor de nitrógeno líquido estático.

60 3. Evaluación de la movilidad post descongelación. Se realizaron evaluaciones de los espermatozoides en la congelación y post descongelación como se describe para el ejemplo 2 con la excepción de que la movilidad progresiva se evaluó 0.5 y 2.0 h después de la incubación.

4. Análisis estadístico. Una descripción general de los análisis estadísticos se proporciona en el ejemplo 2. Específicamente, se evaluaron los efectos del tratamiento mediante análisis de varianza diferentes para cada tiempo de incubación; el modelo incluyó los factores toro y extensor en el gráfico principal y observador e interacciones relacionadas en el subgráfico. Las diferencias en las medias se determinaron mediante la prueba de menor diferencia significativa.

5. Resultados. El extensor afectó ($P < 0.05$) la movilidad progresiva de los espermatozoides después de 0.5 o 2 h de incubación post descongelación (Tabla 7). A 0.5 h, WET más SDS dio lugar a menor movilidad que Tris con SDS. A 2 h, todos los tratamientos con espermatozoides clasificados a granel fueron peores que los espermatozoides de control sin clasificar. Hubo efectos significativos de los factores toro y observador ($P < 0.01$) a ambos tiempos de incubación, pero no interacciones observador por tratamiento.

Tabla 7. Efecto del extensor sobre la movilidad progresiva post descongelación (%)

Extensor	Incubación a 37°C	
	0.5 h	2 h
Tris (sin clasificar)	42 ^a	41 ^a
Tris con o sin SDS	40 ^{a,b}	35 ^b
Tris con SDS	42 ^a	37 ^b
WET con o sin SDS	40 ^{a,b}	35 ^b
WET con SDS	38 ^b	35 ^b
E.E. ^c	1.0	1.2
^{a,b} Las medias dentro de las columnas sin supraíndices comunes difieren ($P < 0.05$)		
^c		
$\sqrt{\text{error de mín. cuadrad. de ANOVA} \div N}$		

6. Conclusión. La inclusión de SDS en los extensores Tris o WET no benefició la calidad de los espermatozoides según lo determinado por las estimaciones visuales de movilidad después de descongelar. Además, los resultados usando extensores WET y Tris fueron similares; por lo tanto, WET fue tan eficaz como Tris para crioconservar espermatozoides bovinos clasificados.

Ejemplo 6

Calidad de los espermatozoides sexados mediante clasificación por flujo para pruebas de campo

Objetivo: evaluar la calidad post descongelación de espermatozoides clasificados en la integridad acrosómica.

1. Recolección de la muestra original. Se recolectó el semen de 3 toros y se preparó del modo descrito en el ejemplo 1A.

2. Métodos. Los espermatozoides clasificados y los espermatozoides de control sin clasificar del mismo eyaculado se tiñeron, se procesaron y se clasificaron como se describe en el ejemplo 2 excepto que los espermatozoides se clasificaron por tipo de sexo a un nivel de pureza del 90%. Se recolectaron espermatozoides clasificados hasta un volumen de aproximadamente 20 ml y se enfriaron a 5° C durante 90 minutos (0.2 °C/min). Después de enfriar, se agregó un volumen igual de extensor de yema de huevo-fracción B de Tris (véase Ejemplo 2) a los espermatozoides clasificados en 2 volúmenes iguales a intervalos de 15 minutos. La centrifugación y aspiración del sobrenadante se lograron como se describe en el ejemplo 5. Después de la centrifugación y la aspiración, el extensor de yema de huevo-Tris que contenía 6% de glicerol (v/v) se agregó al sedimento de espermatozoides para llevar la concentración de éstos a aproximadamente 20×10^6 /ml. La congelación y descongelación se hicieron como se describe en el ejemplo 2 salvo que el tiempo de equilibrado fue de aproximadamente 3 horas.

3. Evaluación de la movilidad post descongelación. Se hicieron estimaciones visuales del porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles a 37 °C aproximadamente 10 minutos después de descongelar. La integridad acrosómica de los espermatozoides se evaluó mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial ($\times 1000$) después de 2 h de incubación a 37 °C. Los espermatozoides se trataron con fluoruro de sodio 40 mM, se preparó un frotis húmedo y se examinaron 100 espermatozoides por tratamiento. Se clasificaron los acrosomas como: (a) acrosoma intacto, (b) acrosoma inflamado o dañado o (c) acrosoma faltante (no intacto).

4. Análisis estadístico. Los datos analizados fueron de 19 fechas de congelación diferentes balanceados entre 3 toros utilizados en pruebas de campo. Los efectos del tratamiento (clasificado vs control) se evaluaron mediante análisis de varianza con los toros como efecto fijo.

5. Resultados. El porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles post descongelación fue

significativamente mayor ($P<0.05$) para espermatozoides no clasificados (50%) que para espermatozoides clasificados (46%; Tabla 8), a pesar de la eliminación de los espermatozoides muertos durante la clasificación. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con un acrosoma intacto no fue diferente. La clasificación aumentó el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma, pero también redujo el porcentaje de espermatozoides con un acrosoma dañado, en comparación con los espermatozoides de control ($P<0.05$). Hubo diferencias significativas entre los toros para el porcentaje de acrosomas intactos ($P<0.05$), el porcentaje de acrosomas no intactos ($P<0.01$) y la movilidad progresiva post descongelación ($P<0.01$). Hubo un efecto del factor toro por clasificación para la movilidad post descongelación ($p<0.01$), pero no para las otras respuestas. De los toros A y B, las diferencias en la movilidad post descongelación entre espermatozoides clasificados y sin clasificar estuvieron cerca de cero; para el toro C, los espermatozoides clasificados tuvieron 10 puntos porcentuales menos en la movilidad que los espermatozoides de control (19%).

Tabla 8.

Efecto de la clasificación sobre la movilidad post descongelación (%) y el estado del acrosoma (%).				
	Estado del acrosoma			
	Intacto	Dañado	No intacto	Movilidad post descongelación
Control	64 ^a	20 ^a	15 ^a	50 ^a
Clasificado	65 ^a	14 ^b	21 ^b	46 ^b

^{a,b} Las medias de las columnas con supraíndices distintos difieren ($P<0.05$)

6. Conclusión. Las estimaciones visuales de movilidad progresiva para espermatozoides clasificados congelados fueron en promedio ligeramente menores (4 puntos porcentuales; 8%) que para los espermatozoides de control, aunque esta diferencia fue mayor para un toro. Estas evaluaciones se realizaron aproximadamente 10 minutos después de descongelar. La diferencia promedio pequeña es compatible con la de los acrosomas no intactos después de 2 h de incubación. Los espermatozoides con un acrosoma dañado o sin acrosoma es probable que sean inmóviles. El mayor porcentaje de espermatozoides con un acrosoma no intacto, para las muestras clasificadas, indica daño asociado a la clasificación o la crioconservación antes o después de su clasificación real. Presumiblemente, la clasificación convirtió los acrosomas dañados en acrosomas faltantes. Basándose en los procedimientos estándar para la evaluación de la calidad de los espermatozoides, no hay base para suponer que el potencial de fertilización de estos espermatozoides clasificados por flujo debería estar seriamente afectado para la mayoría de los toros.

Ejemplo 7

Selección por sexo y crioconservación de espermatozoides de toro usando 20% de extensor de yema de huevo-Tris

Objetivo: proporcionar un protocolo para la crioconservación de espermatozoides de toro clasificados por flujo.

1. Recolección y evaluación del eyaculado. Recolectar y preparar los eyaculados como se describe en el ejemplo 1A. Seleccionar los eyaculados de los toros con >75% de espermatozoides morfológicamente normales. Estimar visualmente el porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles (los eyaculado que tienen movilidad progresiva >60% se clasifican mejor). Agregar antibióticos al semen sin procesar como sigue: tilosina a una concentración final de 100 µg/ml, gentamicina a una concentración final de 500 µg/ml y linco-espectina a una concentración final de 300/600 µg/ml.

2. Tinción y preparación para la clasificación. Luego de la adición de los antibióticos a la muestra de semen sin procesar, dejar en reposo 15 a 20 minutos antes de teñir. Teñir las muestras como se describe en el ejemplo 2.

3. Clasificación. Clasificar por ambos tipos de espermatozoides X e Y, ajustando las ventanas de clasificación para 90% de pureza. Clasificar los espermatozoides en tubos de Falcon de 50 ml que contengan 2 ml de extensor de 20% de yema de huevo-fracción A de Tris (véase Ejemplo 2) hasta que cada tubo contenga un máximo de 20 ml de volumen total (o un máximo de 2 horas por clasificación) y la concentración final de los espermatozoides clasificado sea de 6×10^5 /ml. Tenga en cuenta que se debe agregar 20% adicional de tampón de captura de yema de huevo-fracción A de Tris después de la clasificación y antes de la refrigeración para que el porcentaje final de yema de huevo sea al menos de 3%.

4. Preparación para la congelación. Luego de la clasificación, enfriar las muestras clasificadas hasta 5 °C en un período de 90 minutos. Después de enfriar, agregar extensor de 20% de yema de huevo-fracción B de Tris (véase Ejemplo 2) paso a paso (2X) a intervalos de 15 minutos. El volumen final de fracción B del extensor Tris agregado a la muestra de espermatozoides debería ser igual al volumen de fracción A del extensor Tris. El volumen total de muestra de espermatozoides después de agregar la fracción B del extensor Tris no debe exceder los 27 ml de volumen total.

Después de agregar la fracción B del extensor Tris a la muestra de espermatozoides, concentrar la muestra por centrifugación durante 20 minutos a 850 x g. Aspirar el sobrenadante dejando aproximadamente 150 µl de sedimento de espermatozoides. Resuspender los espermatozoides y agrupar los espermatozoides para cada

toro.

5. Congelación. Agregar extensor completo de yema de huevo-Tris (6% de glicerol) para lograr una concentración final de espermatozoides de $20 \times 10^6/\text{ml}$. Acondicionar los espermatozoides extendidos en pajillas de cloruro de polivinilo de 0.25 ml para congelar como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 8

Evaluación de la fertilidad de espermatozoides de toro clasificados por flujo, congelados, en estudios de campo

Materiales y métodos

Recolección y procesamiento del semen

Se recolectó el semen de toros jóvenes de fertilidad desconocida mediante una vagina artificial (véase Ejemplo 1A). Después de determinar la concentración de espermatozoides con un espectrofotómetro y de la evaluación subjetiva de la movilidad progresiva de los espermatozoides, el semen se procesó y se clasificó como se describe en el ejemplo 2 excepto que los espermatozoides se clasificaron por tipo de sexo a una pureza de 90% usando una potencia de láser incidente de aproximadamente 135 a aproximadamente 150 mW. El procesamiento y la congelación se lograron como en el ejemplo 2 excepto que el tiempo de equilibrado fue de aproximadamente 3 h. Se usó el extensor universal de Cornell (Seidel GE Jr., Theriogenology 1997; 48:1255-1264) para el semen líquido en los ensayos de campo 1, 2 y 3. Para el semen congelado en los ensayos de campo 2 y 3, el extensor utilizado fue 2.9% de citrato de Na + 20% de yema de huevo con una concentración final de glicerol del 7% (véase Ejemplo 1). Para los ensayos de campo 4 a 11, los espermatozoides se congelaron en un extensor a base de Tris compuesto por Tris 200 mM, ácido cítrico 65 mM, fructosa 56 mM, yema de huevo 20% y una concentración final de glicerol de 6% (véase Ejemplo 2). El líquido envolvente utilizado en el citómetro de flujo fue citrato de Na al 2.9% (véase Ejemplo 4) para los ensayos 1, 2 y 3 y un tampón de Tris para los ensayos restantes (véase Ejemplo 2).

Los espermatozoides se acondicionaron en pajillas francesas de 0.25 ml en columnas tan pequeñas como de 50 μl en el centro de la pajilla. Para minimizar los efectos de la dilución, se usaron volúmenes bajos de modo que hubiera al menos 10^7 espermatozoides/ml. En la mayoría de los ensayos, se aspiró primero una columna de extensor sin espermatozoides hacia el interior de la pajilla para humedecer el tapón de algodón, seguido de una columna pequeña de aire y después los espermatozoides sexados. Cuando los espermatozoides se congelaron, una pajilla de cada lote se descongeló en agua a 35 °C durante 30 segundos para controlar la calidad, y los lotes con menos de 25% de movilidad progresiva post descongelación se descartaron. Una muestra de espermatozoides sexados de cada lote se sometió a ultrasonido y se analizó por citometría de flujo para determinar la precisión del sexado.

Manejo de las vaquillonas e inseminación artificial

Las vaquillonas utilizadas estaban en 6 unidades de producción ampliamente dispersas con prácticas de manejo diferentes. Las diferencias estacionales y de raza contribuyeron aún más a la heterogeneidad de los experimentos (Tabla 9). En la medida de lo posible, se alternaron sistemáticamente tratamientos y controles entre toros entre inseminadores a medida que la vaquillonas ingresaban en las instalaciones de inseminación.

El celo se sincronizó de una de 4 maneras (Tabla 9): (1) 500 mg de acetato de melengesterol (MGA) ingeridos diariamente en 2.3 kg de grano durante 14 días seguido de una inyección i.m. de 25 mg de prostaglandina F₂ α (Lutalyse, Upjohn, Kalamazoo, MI, EE.UU.) 17, 18 o 19 días después del último día de la ingestión de MGA (MGA/PG); (2) una sola inyección de 25 mg de prostaglandina F₂ α (PG); (3) 20 o 25 mg de prostaglandina F₂ α inyectada i.m. a intervalos de 12 días (PG/PG) o (4) 50 o 100 Tg de GnRH inyectados i.m., seguido de 25 mg de prostaglandina F₂ α 7 días más tarde (GnRH/PG).

Las vaquillonas se inspeccionaron visualmente en las mañanas y las tardes para ver si estaban en celo, pero se las inseminó sólo en las tardes después de las 16:00, aproximadamente $\frac{1}{2}$ o 1 día después del inicio del celo. La inseminación fue convencionalmente en el cuerpo uterino, o la mitad en cada cuerno uterino usando vainas de transferencia atraumática de embriones (IMV, Minneapolis, MN, EE.UU.). En este último caso, el semen se depositó más allá de la curvatura mayor del cuerno uterino tan anterior como podría lograrse sin trauma, idénticamente a la transferencia de embriones no quirúrgica. En la mayoría de los casos el semen se depositó entre el tercio anterior y la mitad del cuerno.

La mayoría de los experimentos incluyeron un control de espermatozoides congelados e inseminados en el cuerpo uterino con 20 o 40×10^6 espermatozoides/dosis de los mismos toros utilizados para obtener espermatozoides clasificados por tipo de sexo ("sexados"). Este control sirvió como una estimación compuesta de la fertilidad normal intrínseca de la vaquillonas en las condiciones específicas del ensayo de campo, así como de la fertilidad de los toros utilizados y la habilidad de los inseminadores. Algunos ensayos también incluyeron un grupo de control sin sexar de dosis baja. Algunas veces se planeó que el número de inseminaciones de control fuera 1/2 o 2/3 del

número utilizado para cada tratamiento para obtener más información sobre los espermatozoides sexados. Los espermatozoides sexados y de control congelados se descongelaron durante 20 a 30 segundos en un baño de agua entre 35 y 37 °C. Otros varios detalles se resumen en la tabla 9.

- 5 Se diagnosticó la preñez mediante ultrasonido 28 a 37 d post inseminación y/o 56 a 92 d post inseminación, momento en el cual se determinó el sexo del feto en la mayoría de los ensayos, como se describe en Curran, S., Theriogenology 1991; 36:809-814, sin que el operador conociera los tratamientos de inseminación o controles. El sexo de los terneros nacidos fue casi idéntico al del diagnóstico de sexo fetal. Los datos se analizaron por chi cuadrado con un solo grado de libertad corregida por continuidad; se usaron pruebas bilaterales a menos que se especifique monolateral. Se desearon menos del 5% de las inseminaciones debido a errores del tratamiento de inseminación, infección franca del aparato reproductivo, imposibilidad de atravesar el cuello uterino, etc. Las decisiones de desechar animales de los experimentos se tomaron muy poco después de la inseminación y nunca se basaron en el diagnóstico de preñez.

15 Tabla 9. Detalles de procedimientos de las pruebas de campo

Ensayo	Fechas de inseminación	Razas de vaquillonas	Toros utilizados	Inseminadores	Sincronización del celo	Comentarios
1	5/20-23, 1997	Angus	N1, N2, AN4	A, B	MGA/PG	Incluidos controles de dosis baja
2	2/18-5/22, 1998	Angus cruza	N3, N4, N5, N6	C, D	PG/PG	Controles de dosis baja pero no dosis normal; algunas vaquillonas sincronizadas
3	6/2-6/5, 1998	Angus	AN4, AN5, N7, N8	B, D	MGA/PG	
4	2/10-13, 1999	Holstein	J2, J4	C, D	PG	Barro, nieve, viento y aguanieve muy severos
5	2/24-26, 1999	Holstein	J2, J4, J5	C, B, D	PG/PG	
6	4/14-16, 1999	Holstein	J2, J3, J4, J5	C, D	PG	Alguna vaquillonas fueron reproductores de desecho
7	4/27-5/1, 1999	Cruza de Hereford y Angus	AN1, AN4	C	MGA/PG	Semen de un toro despachado 6 h antes de la clasificación; clima severo
8	4/21-23, 1999	Angus cruza	H1, H2	E	MGA/PG	Vaquillonas de engorde a corral
9	5/5-8, 1999	Angus rojo	AR1, AR2	C, F	MGA/PG	
10	5/31-6/2, 1999	Angus	AN4, AN7, AN8	B, D	GnRH/ PG	

Ensayo	Fechas de inseminación	Razas de vaquillonas	Toros utilizados	Inseminadores	Sincronización del celo	Comentarios
11	7/28-30, 1999	Holstein	H2, H3	C, D	PG/PG	Primer duplicado disponible en un ensayo mucho más grande

Resultados y discusión

- Los datos presentados corresponden a 11 ensayos de campo heterogéneos, consecutivos, restringidos por aspectos logísticos de los estudios, como tener que compatibilizar los toros con las necesidades genéticas de la manada, no disponer de la información sobre la fertilidad de los toros, número limitado de vaquillonas, no disponer de los mismos inseminadores entre ensayos, condiciones climáticas muy severas en algunos ensayos, cantidades limitadas de semen sexado en ensayos anteriores, 2 conjuntos de vaquillonas en los cuales algunas resultaron estar preñadas hasta aproximadamente de 55 días en el momento de la sincronización del celo, etc. Hasta 4 toros y 3 inseminadores estuvieron implicados en cada ensayo, esto nos permitió muestrear poblaciones para asegurar que los resultados se aplicaran a más de un toro o técnico; sin embargo, se produjeron datos insuficientes para evaluar rigurosamente las diferencias en la fertilidad toro a toro.
- La mayoría de los conjuntos de vaquillonas fueron de manadas de cría ubicadas 140 a 250 km de distancia de nuestro laboratorio. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de preñez entre los inseminadores en ningún ensayo, pero el número de crías por inseminador fue bajo y probablemente se podrían detectar diferencias con un mayor número de inseminaciones.
- Los métodos de sincronización del celo no se compararon entre ensayos, por lo tanto no fue posible comparar las tasas de preñez entre estos métodos. Las tasas de preñez parecieron ser satisfactorias para los cuatro procedimientos de sincronización utilizados.
- Puesto que las inseminaciones se realizaron una vez al día, las vaquillonas en celo por la tarde se inseminaron aproximadamente 24 h después de detectado el celo. La tasa de preñez para esas vaquillonas con espermatozoides sexados agrupados en todos los ensayos fue de 203/414 (49.0%), que no fue significativamente diferente ($P > 0.1$) del de las vaquillonas en celo por las mañanas y por lo tanto inseminadas medio día después de la detección del celo 266/586 (45.4%). Esta tendencia de mayor fertilidad con inseminación más tardía está de acuerdo con los resultados de otras investigaciones de que es preferible inseminar más tarde que lo que se recomienda normalmente con toros de fertilidad menor, cuando se usan bajas cantidades de espermatozoides o cuando las condiciones son subóptimas.
- Las tasas de preñez por tratamiento y, cuando se dispone, el sexo fetal o del ternero se presentan en las tablas 10 a 20. El objetivo fue obtener crías hembra, excepto en el ensayo 8; la precisión fue de 95%, 83%, 90%, 83%, 82% y 94% en los ensayos 1, 3, 8, 9, 10 y 11, respectivamente. En el resto de los ensayos, no se dispuso de los sexos fetales o al nacimiento debido al momento del diagnóstico de la preñez, no disponer de personas especializadas en el sexado de fetos o porque los terneros aún no habían nacido. Esto no fue un motivo de gran preocupación porque el objetivo principal de esta investigación era determinar la fertilidad de espermatozoides clasificados por flujo en dosis bajas.
- La precisión del sexado se puede ajustar a virtualmente cualquier nivel deseado entre 50 y 95% ajustando los parámetros de clasificación. Sin embargo, se obtienen resultados con mayor precisión a menores cantidades de espermatozoides clasificados por unidad de tiempo, particularmente para los espermatozoides con cromosoma Y. Una precisión del 90% es suficiente para el trabajo de rutina.
- Se resumirán los principales resultados de cada ensayo de campo a su vez. Tenga en cuenta que el número total de espermatozoides se indica en los encabezados de las tablas; la cantidad de espermatozoides progresivamente móviles fue generalmente de 30 a 50% de estos valores. El ensayo de campo 1 (Tabla 10) confirmó que las tasas de preñez con inseminación en el cuerno uterino usando baja cantidad de espermatozoides no sexados fueron similares a las de los controles con cantidades normales de espermatozoides. La tasa de preñez del día 64 a 67 con espermatozoides sexados descongelados (42%) fue 12 puntos porcentuales inferior a la del control líquido sin sexar con espermatozoides diluidos, teñidos y centrifugados idénticamente a los espermatozoides clasificados. La precisión del sexado fue de 95%; el sexo de los terneros nacidos de espermatozoides sexados fue exactamente compatible con el diagnóstico de sexo de los fetos; hubo un error en el sexado de los fetos de los controles. No hubo abortos en los 2 meses de gestación y término, y los 19 terneros del tratamiento con espermatozoides sexados fueron normales y sobrevivieron. Para el tratamiento con semen sexado, las tasas de preñez de dos meses para los toros N1, N2 y N3 fueron 41, 44 y 40%, respectivamente; 39% (13/33) de las vaquillonas en celo en la mañana y 50% (6/12) en celo en la tarde quedaron preñadas.

Tabla 10. Resultados del ensayo de campo 1 - Vaquillonas Angus en Wyoming, 1997

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 31 y 33	Nº de preñadas entre el día 64 y 67	Nº de crías hembra
Sexado, 5 °C/cuernos	3 x 10 ⁵	45	20 (44%)	19 (42%)	18 (95%) ^a
Control, 5 °C/cuerno	3 x 10 ⁵	28	15 (54%)	15 (54%)	5 (53%) ^b
Congelado, control/cuerpo	40 x 10 ⁶	29	16 (55%)	15 (52%)	11 (73%) ^{a,b}

^{a,b} Las proporciones de sexo sin supraíndices comunes difieren (P<0.02)

El ensayo de campo 2 (Tabla 11) proporcionó la primera evidencia de que los resultados con espermatozoides sexados congelados son similares a los de espermatozoides sexados sin congelar si se hacen los ajustes por la cantidad de espermatozoides muertos durante la crioconservación. No hubo diferencia en las tasas de preñez entre espermatozoides sexados almacenados a 5 vs. 18 °C. Las tasas de preñez 2 meses después de la inseminación para el semen sexado de cada toro variaron de 22 a 42% (P>0.05). Las pérdidas de embriones entre los meses 1 y 2 de gestación fueron muy similares para las preñeces sexadas y de control. Se dispuso de datos de parición de 39 vaquillonas de este ensayo; cada una de estas vaquillonas (30 preñeces sexadas, 9 controles) preñadas a los 2 meses parieron después de un período de gestación normal.

Tabla 11. Resultados del ensayo de campo 2 — vaquillonas cruza de carne en Colorado, 1998

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 30 y 35 ^a	Nº de preñadas entre el día 59 y 92 ^a
Control, 5 °C/cuerno	5 x 10 ⁵	58	27 (47%)	24 (41%)
Sexado, 5 °C/cuernos	5 x 10 ⁵	51	17 (33%)	16 (31%)
Sexado, 18 °C/cuernos	5 x 10 ⁵	46	16 (35%)	12 (26%)
Sexado, congelado/cuernos	1 x 10 ⁶	87	29 (33%)	28 (32%)

^a Sin diferencias significativas, χ^2 .

El ensayo de campo 3 (Tabla 12) confirmó que los espermatozoides sexados congelados producen tasas de preñez razonables. La precisión del sexado de espermatozoides se volvió a confirmar; sin embargo, hubo 4 errores en el sexado de fetos con respecto a los terneros nacidos; se presentan los sexos reales de los terneros nacidos. Nuevamente, no hubo abortos en los 2 meses de gestación y término. Las tasas de preñez promediadas entre espermatozoides sexados sin congelar y sexados congelados para los toros N8, N9, AN5 y AN4 fueron 24, 31, 50 y 60%, respectivamente (P<0.1).

Tabla 12. Resultados del ensayo de campo 3 -- Vaquillonas Angus en Wyoming, 1998

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 62 y 65	Nº de crías hembra
Sexado, 18 °C/cuernos	5 x 10 ⁵	37	11 (30%) ^a	10 (91%) ^c
Sexado, congelado/cuernos	1 x 10 ⁶	35	18 (51%) ^{a,b}	14 (78%) ^c
Congelado, control/cuerpo	40 x 10 ⁶	37	27 (73%) ^b	16 (59%) ^d

^{a,b} Las medias sin supraíndices comunes difieren (P<0.05)
^{c,d} El porcentaje de crías ♀ de los tratamientos sexados (83%) difirió del % del grupo de control, P<0.05, monolateral, χ^2 .

Los ensayos de campo 4, 5 y 6 (Tablas 13, 14 y 15) se hicieron en la misma ubicación con 3 grupos diferentes de vaquillonas. Desafortunadamente, no fue posible reproducir cada ensayo de manera similar debido a caprichos de los ensayos de campo, como programación del personal, disponibilidad de semen sexado de cada toro, etc. Las tasas de preñez ampliamente diferentes entre los ensayos 5 y 6 ilustran que las condiciones entre ensayos fueron diferentes. Algunas de las vaquillonas en el ensayo 6 estuvieron disponibles porque no quedaron preñadas luego de un mes de apareamiento natural. En las condiciones de estos ensayos, las tasas de preñez fueron muy similares entre 1.5 y 3.0 x 10⁶ espermatozoides sexados, congelados/dosis. Además, no hubo ninguna ventaja respecto a la inseminación en el cuerno uterino. No se encontraron diferencias significativas (P>0.05) en las tasas de preñez entre

toros excepto en el ensayo 5 en el cual la tasa de preñez de J2, 20/28 (71%), fue mayor que la de J4, 15/39 (38%) ($P < 0.05$). Esta diferencia no fue constante de ensayo a ensayo, ya que J4 tuvo numéricamente pero no de forma significativa ($P > 0.1$) mayores tasas de preñez que J2 en los ensayos 4 y 6.

5 Tabla 13. Resultados del ensayo de campo 4 – Vaquillonas Holstein en Colorado, 1999

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 30 y 33	Nº de preñadas entre el día 64 y 67*
Sexado, congelado/cuerpo	1.5×10^6	55	36 (65%) ^{a,b}	36 (65%) ^{a,b}
Sexado, congelado/cuerpo	3×10^6	52	27 (52%) ^a	26 (50%) ^a
Control, congelado/cuerpo	20×10^6	55	45 (82%) ^b	43 (78%) ^b

^{a,b} Las medias sin supraíndices comunes difieren ($P < 0.01$)

* Seis vaquillonas preñadas entre el día 30 y 33 se vendieron antes del segundo diagnóstico de preñez; se supuso que habían permanecido preñadas.

Tabla 14. Resultados del ensayo de campo 5 – Vaquillonas Holstein en Colorado, 1999

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 33 y 35 ^a	Nº de preñadas entre el día 60 y 62 ^a
Sexado, congelado/cuerpo	1.5×10^6	23	12 (52%)	12 (52%)
Sexado, congelado/cuerpo	3.0×10^6	25	15 (60%)	14 (56%)
Sexado, congelado/cuernos	1.5×10^6	25	15 (60%)	12 (48%)
Sexado, congelado/cuernos	3.0×10^6	25	17 (68%)	15 (60%)
Control, congelado/cuerpo	20×10^6	30	20 (67%)	19 (63%)

^a Sin diferencias significativas.

Tabla 15. Resultados del ensayo de campo 6 – Vaquillonas Holstein en Colorado, 1999

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 31 y 34	Nº de preñadas entre el día 60 y 63
Sexado, congelado/cuerpo	1.5×10^6	27	11 (41%) ^a	9 (33%) ^a
Sexado, congelado/cuerpo	3.0×10^6	25	10 (40%) ^a	9 (36%) ^a
Sexado, congelado/cuernos	1.5×10^6	24	8 (33%) ^a	7 (29%) ^a
Sexado, congelado/cuernos	3.0×10^6	24	10 (42%) ^a	8 (33%) ^a
Control, congelado/cuerpo	20×10^6	24	18 (75%) ^b	17 (71%) ^b

^{a,b} Las medias sin supraíndices comunes difieren ($P < 0.05$)

10 Para el ensayo 7 (Tabla 16), solamente estuvo disponible un inseminador debido a reprogramación. Este es el único ensayo que mostró una ventaja convincente de la inseminación en el cuerno uterino respecto al cuerpo uterino. Para este inseminador en las condiciones del ensayo, 55% más vaquillonas (22 puntos porcentuales) quedaron preñadas con semen sexado congelado inseminadas en los cuernos uterinos que en el cuerpo uterino. La verdadera diferencia

15 pudo ser menor debido a que hay intervalos de confianza amplios en estas medias. En todos los otros ensayos (5, 6, 9 y 11) en los cuales se comparó la inseminación en el cuerpo y en el cuerno, las tasas de preñez fueron muy similares para ambos métodos para este técnico así como para otros técnicos.

20 El semen de uno de los toros utilizado en el ensayo 7 se despachó sin diluir desde Montana por vía aérea en una caja aislada a $\sim 20^\circ\text{C}$ antes de la clasificación; el tiempo de envío fue de 6 h. Las tasas de preñez para los espermatozoides sexados de los dos toros fueron virtualmente idénticas, 49% para el semen que no fue despachado y 52% para el despachado. El semen no se diluyó con extensor y no se enfrió para el envío debido a que las propiedades de tinción de los espermatozoides con Hoechst 33342 se alteran por dilución con extensores. Además, en otros estudios (véase Ejemplo 4), se demostró que almacenar semen puro a temperatura ambiente entre la recolección y la clasificación por flujo era superior a diluirlo.

25

Tabla 16. Resultados del ensayo de campo 7 - Vaquillonas de carne cruzada en Colorado, 1999

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 33 y 37
Sexado, congelado/cuerpo	1.5×10^6	86	34 (40%) ^a
Sexado, congelado/cuernos	1.5×10^6	86	53 (62%) ^b
Control, congelado/cuerpo	20×10^6	35	18 (51%) ^{a,b}

^{a,b} Las medias sin supraíndices comunes difieren ($P < 0.01$)

El ensayo de campo 8 (Tabla 17) correspondió a vaquillonas de engorde a corral no implantadas con promotores del crecimiento; en el momento del diagnóstico de la preñez habían abortado, así no hay disponibles datos de parición. Este experimento ilustra que se puede hacer sexado eficaz que apunte a los machos. Las tasas de preñez para los 2 toros fueron de 50 y 61%.

Tabla 17. Resultados del ensayo de campo 8 – Vaquillonas Angus en Nebraska, 1999

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas ^a entre el día 74 y 76	Nº de fetos ♂
Sexado, congelado, láser de 72 mW/cuerpo	1×10^6	18	7 (39%)	6 (86%)
Sexado, congelado, láser de 135 mW/cuerpo	1×10^6	18	13 (78%)	12 (92%)

^a Sin diferencias significativas.

El ensayo de campo 9 (Tabla 18) fue el único ensayo que mostró una ventaja convincente de 3.0 versus 1.5×10^6 espermatozoides sexados congelados/dosis de inseminación. Esta ventaja fue cierta para ambos inseminadores. Las tasas de preñez para espermatozoides sexados de los 2 toros fueron 62 y 75%.

Tabla 18. Resultados del ensayo de campo 9 - Vaquillonas Angus rojo en Nebraska, 1999

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 60 y 63 ^a	Nº de fetos ♀
Sexado, congelado/cuerpo	1.5×10^6	15	8 (53%)	7 (88%)
Sexado, congelado/cuerpo	3.0×10^6	14	12 (86%)	9 (75%)
Sexado, congelado/cuernos	1.5×10^6	16	9 (56%)	7 (78%)
Sexado, congelado/cuernos	3.0×10^6	16	12 (75%)	11 (92%)
Control, congelado/cuerpo	20×10^6	30	21 (70%)	13 (62%)

^a 3.0×10^6 espermatozoides sexados tuvieron una mayor tasa de preñez (80%) que 1.5×10^6 espermatozoides sexados (55%), $P < 0.05$, monolateral χ^2 .

Las tasas de preñez en el ensayo de campo 10 (Tabla 19) con semen sexado congelado, fueron similares a las de los controles; la precisión del sexado de los espermatozoides en este ensayo fue solo de 82%, lo cual, sin embargo, no es significativamente diferente de la precisión de 90% deseada. Las tasas de preñez para semen sexado fueron 54, 66 y 50% para los toros AN4, AN7 y AN8, respectivamente ($P > 0.1$). Dieciocho de las vaquillonas inseminadas en este ensayo fueron terneras que resultaron de los espermatozoides sexados en el ensayo de campo 1.

Tabla 19. Resultados del ensayo de campo 10 -- Vaquillonas Angus en Wyoming, 1999

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas entre el día 61 y 63 ^a	Nº de fetos ♀
Sexado, congelado/cuerpo	1×10^6	44	26(59%)	23(85%)
Sexado, congelado/cuerpo	3×10^6	43	23 (53%)	17 (74%)
Control, congelado/cuerpo	20×10^6	35	20(57%)	12(57%)

^a Sin diferencias significativas.

Tabla 20. Resultados del ensayo de campo 11 – Vaquillonas Holstein en Colorado, 1999

Tratamiento/sitio	Nº de espermatozoides	Nº de vaquillonas de	Nº de preñadas entre el día 28 y 30a	Nº de preñadas entre el día 56 y 58 ^{a,b}
Sexado, congelado/cuerpo	1 x 10 ⁶	12	8 (67%)	7 (58%)
Sexado, congelado/cuerpo	3 x 10 ⁶	12	6 (50%)	4 (33%)
Sexado, congelado/cuernos	1 x 10 ⁶	7	4 (57%)	4 (57%)
Sexado, congelado/cuernos	3 x 10 ⁶	7	4 (57%)	4 (57%)
Control, congelado/cuerpo	20 x 10 ⁶	9	4 (44%)	3 (33%)

^a Sin diferencias significativas, χ^2 .
^b 16 de 17 (94%) fetos de los tratamientos con semen sexado fueron hembras; 2 estaban muy profundo en la cavidad del cuerpo para sexar con ultrasonido.

Se combinaron los datos de los ensayos en los cuales los tratamientos fueron idénticos excepto que se agruparon las dosis de espermatozoides 1 x 10⁶ y 1.5 x 10⁶ (Tabla 21).

5 Tabla 21. Meta-resumen de la combinación de los ensayos con semen sexado, congelado y controles congelados.

Ensayos combinados	Nº de espermatozoides/sitio	Nº de vaquillonas	Nº de preñadas
5,6,9,11	1.0 - 1.5 x 10 ⁶ /cuerpo	77	36 (47%)
	3.0 x 10 ⁶ /cuerpo	76	38 (50%)
	1.0 - 1.5 x 10 ⁶ /cuernos	72	32 (44%)
	3.0 x 10 ⁶ /cuernos	72	39 (54%)
	20 x 10 ⁶ /cuerpo, control	93	61 (66%)
4, 5, 6, 9, 10, 11	1.0 - 1.5 x 10 ⁶ /cuerpo	176	98 (56%)
	3.0 x 10 ⁶ /cuerpo	171	88 (51%)
	20 x 10 ⁶ /cuerpo, control	183	124 (68%)
5,6,7,9,11	1.5 x 10 ⁶ /cuerpo	163	70 (43%)
	1.5 x 10 ⁶ /cuerno	158	85 (54%)
	20 x 10 ⁶ /cuerpo, control	128	79 (62%)

Las tasas de preñez con espermatozoides sexados fueron generalmente 70 a 90% de los controles sin sexar entre experimentos con 7 a 20 veces más espermatozoides. Esta diferencia fue menor en los ensayos más recientes, reflejando posiblemente mejores procedimientos de sexado y procesamiento de los espermatozoides.

En algunos ensayos, se examinó la preñez de las vaquillonas mediante ultrasonido 1 y 2 meses después de la inseminación. Las pérdidas de embarazos en este intervalo fueron similares ($P>0.1$) para tratamientos con espermatozoides sexados (23/261; 8.8%) versus control (9/145; 6.2%), que es una medida de que el daño genético debido al sexado es mínimo. La información sobre parición se obtuvo sólo de unas pocas vaquillonas preñadas porque la mayor parte del ganado de los ensayos más tempranos se vendió y el de los ensayos más tardíos todavía no habían parido. La población de terneros producida hasta la fecha a partir de semen sexado parece no ser diferente de la población de los controles.

Conclusión

Las proporciones de sexo en el ganado se puede distorsionar hasta aproximadamente 90% de cada sexo clasificando los espermatozoides basándose en el contenido de ADN con un citómetro de flujo/clasificador de células seguido de crioconservación e inseminación artificial relativamente rutinaria. Los terneros resultantes de los espermatozoides sexados parecen ser normales. Para la mayoría de los toros de estos estudios, las tasas de preñez con 1.0 a 1.5 x 10⁶ espermatozoides sexados congelados fueron 70 a 90% de los controles sin sexar con 20 o 40 x 10⁶ espermatozoides congelados, inseminados convencionalmente. Estos resultados se aplican a vaquillonas bien manejadas e inseminadas por técnicos bien entrenados usando semen procesado adecuadamente. Puede haber una pequeña ventaja en inseminar con espermatozoides sexados bilateralmente en los cuernos uterinos en comparación con la inseminación estándar en el cuerpo uterino.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la crioconservación de espermatozoides bovinos seleccionados por sexo que comprende:
 - (a) obtener una muestra de semen bovino;
 - (b) agregarle un extensor inicial y seleccionar el semen por sexo mediante citometría de flujo;
 - (c) enfriar dicha muestra de semen seleccionado;
 - (d) aislar por centrifugación los espermatozoides de dicha muestra de semen seleccionado fría para producir espermatozoides aislados fríos;
 - (e) agregar un extensor final a dichos espermatozoides aislados fríos para producir una suspensión de espermatozoides fría, en la cual el extensor final contiene un crioprotector, Tris[hidroximetil]aminometano y ácido cítrico; y
 - (f) congelar dicha suspensión de espermatozoides.
2. El método de la reivindicación 1 donde el enfriamiento se lleva a cabo reduciendo la temperatura de la muestra de semen seleccionado hasta aproximadamente 5 °C.
3. El método de la reivindicación 2 donde el enfriamiento se lleva a cabo en un período entre aproximadamente 60 minutos y aproximadamente 240 minutos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el extensor final agregado a dicha muestra de espermatozoides seleccionados contiene además uno o más de los componentes siguientes: una sustancia orgánica que reduce el choque por frío y mantiene la fertilidad de los espermatozoides, una fuente de energía, una sustancia que facilita la capacitación de los espermatozoides y un antibiótico.
5. El método de la reivindicación 4 donde dicho crioprotector se elige del grupo que consiste en disacáridos, trisacáridos y cualquiera de sus combinaciones.
6. El método de la reivindicación 4 donde dicho crioprotector se elige del grupo que consiste en glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, propilenglicol y cualquiera de sus combinaciones.
7. El método de la reivindicación 4 donde dicha sustancia orgánica se elige del grupo que consiste en yema de huevo, un extracto de yema de huevo, leche, un extracto de leche, caseína, albúmina, lecitina y cualquiera de sus combinaciones.
8. El método de la reivindicación 4 donde dicha fuente de energía es un monosacárido que se elige del grupo que consiste en glucosa, fructosa, manosa y cualquiera de sus combinaciones.
9. El método de la reivindicación 4 donde dicho antibiótico se elige del grupo que consiste en tilosina, gentamicina, lincomicina, linco-espectina, espectinomina, penicilina, estreptomina y cualquiera de sus combinaciones.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde, después de la adición del extensor final, la muestra de semen y la suspensión de espermatozoides, respectivamente, contienen glicerol, citrato de sodio, Tris[hidroximetil]aminometano, yema de huevo, fructosa y uno o más antibióticos.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho extensor final tiene un pH en el rango de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7.5.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicha centrifugación permite la recuperación de al menos aproximadamente 50% a aproximadamente 90% de los espermatozoides.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la concentración de espermatozoides en dicha suspensión antes de la congelación es de aproximadamente $1 \times 10^6/\text{ml}$ a aproximadamente $300 \times 10^6/\text{ml}$.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los espermatozoides se seleccionan por citometría de flujo en el paso (b) de modo de producir una muestra de semen seleccionado que incluya una fracción A de un extensor que carezca de glicerol, y donde una fracción B que contiene glicerol se agrega a la muestra de semen seleccionado antes del aislamiento del paso (d).