

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 799**

51 Int. Cl.:

C12N 5/076 (2010.01)

A61D 19/02 (2006.01)

A61K 35/52 (2015.01)

B01J 13/00 (2006.01)

C12N 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2008** **PCT/SE2008/050997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2009** **WO09031970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008** **E 08829030 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2198015**

54 Título: **Composición para la separación de espermatozoides de una muestra de semen**

30 Prioridad:

07.09.2007 SE 0701999

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2018

73 Titular/es:

MORRELL, JANE (50.0%)

DALBY-TUNA 50

755 91 UPPSALA, SE y

RODRIGUEZ-MARTINEZ, HERIBERTO (50.0%)

72 Inventor/es:

MORRELL, JANE y

RODRIGUEZ-MARTINEZ, HERIBERTO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 656 799 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

Composición para la separación de espermatozoides de una muestra de semen

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina veterinaria, más específicamente a composiciones y procedimientos útiles para procesar semen animal para su uso en reproducción asistida.

Antecedentes de la invención

10 La inseminación artificial (AI) se ha usado en el ganado productor de leche y el ganado porcino desde hace varias décadas. Sin embargo, se necesitan procedimientos para mejorar la calidad del esperma en las dosis de esperma usadas para la AI debido a diversas razones: (i) para retirar los espermatozoides de los factores inhibidores en el plasma seminal, por ejemplo, los factores decapacitantes; (ii) para seleccionar los espermatozoides maduros, normales y viables entre la población de esperma total en el eyaculado; (iii) para separar los espermatozoides de las fuentes de especies de oxígeno reactivo que son perjudiciales para la supervivencia del esperma. Estas funciones normalmente se realizan en el tracto reproductivo femenino durante el apareamiento natural, pero pueden estar parcialmente ausentes cuando los espermatozoides se introducen por inseminación artificial. Además, cuando los espermatozoides han de ser usados para una fertilización *in vitro*, estos mecanismos de selección están completamente ausentes, y los espermatozoides deben ser separados del plasma seminal antes de usarlos.

20 La inseminación artificial (AI) se ha usado en el ganado productor de leche y el ganado porcino desde hace varias décadas. Sin embargo, se necesitan procedimientos para mejorar la calidad del esperma en las dosis de esperma usadas para la AI debido a diversas razones: (i) para retirar los espermatozoides de los factores inhibidores en el plasma seminal, por ejemplo, los factores decapacitantes; (ii) para seleccionar los espermatozoides maduros, normales y viables entre la población de esperma total en el eyaculado; (iii) para separar los espermatozoides de las fuentes de especies de oxígeno reactivo que son perjudiciales para la supervivencia del esperma. Estas funciones normalmente se realizan en el tracto reproductivo femenino durante el apareamiento natural, pero pueden estar parcialmente ausentes cuando los espermatozoides se introducen por inseminación artificial. Además, cuando los espermatozoides han de ser usados para una fertilización *in vitro*, estos mecanismos de selección están completamente ausentes, y los espermatozoides deben ser separados del plasma seminal antes de usarlos.

25 Durante los últimos 15 años, se ha usado la técnica de centrifugación con gradiente de densidad para preparar los espermatozoides humanos para su uso en la reproducción asistida (WHO, 1999). Originalmente, se usaban partículas de sílice recubiertas con polivinilpirrolidona, pero en las formulaciones más recientes se han usado partículas de sílice recubiertas con silano en el gradiente de densidad.

30 Las suspensiones de esperma preparadas se usan **inmediatamente** para la fertilización *in vitro*, la inyección intracitoplásmica de esperma o el depósito intrauterino.

35 Las formulaciones coloidales disponibles en el mercado para preparar espermatozoides humanos para la reproducción asistida, por ejemplo, Puresperm (Nidacon International AB), tienen una osmolaridad de 300-310 mOsm, de acuerdo con el sitio de Internet de la compañía y la bibliografía promocional. Hasta el momento, los únicos productos disponibles en el mercado para los gradientes de densidad para espermatozoides de animales mencionados en la bibliografía también tenían una osmolaridad dentro del intervalo de 300-310 mOsm, por ejemplo, Equipure y Bovipure (ambos producidos por Nidacon International). Aunque se ha informado que Bovipure proporciona buenos resultados cuando se usa para preparar espermatozoides bovinos para la IVF (4), el uso de Equipure como gradiente de densidad para espermatozoides de caballo no proporcionó los mismos efectos beneficiosos sobre la calidad del esperma (5) que los que se han informado para los espermatozoides humanos (6).

40 La preparación de las muestras de semen humano comúnmente se realiza en alícuotas de 1,5 ml. Aunque la preparación de semen de animales en volúmenes tan pequeños es apropiada para preparar espermatozoides para la IVF o la ICSI, se necesitan cantidades de esperma mucho mayores para la inseminación artificial en animales. En consecuencia, existe la necesidad de procedimientos sencillos y convenientes para preparar espermatozoides a partir de semen de animales en el sitio de la recolección y en cantidades apropiadas para usar en la inseminación artificial. También existe la necesidad de composiciones específicas para animales y apropiadas para usar en dichos procedimientos.

Sumario de la invención

50 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición para separar los espermatozoides de una muestra de semen de acuerdo con la reivindicación 1. Teniendo dicha composición un pH de 7,0-7,35 y una osmolaridad de 300-345 mOsm.

La composición comprende

- cloruro sódico en una concentración de 97,5-140,0 mM

- cloruro potásico en una concentración de 4,0-5,5 mM
 - glucosa en una concentración de 1,0-1,4 mM
 - EDTA en una concentración de 0,10-0,14 mM
 - HEPES en una concentración de 15,0-19,0 mM
- 5 - citrato tri-sódico en una concentración de 4,8-8,3 mM
- lactato en una concentración de 0-4,0 mM;
 - partículas de sílice recubiertas con silano en una concentración de 300-1000 g/l, y
 - agua.
- 10 En una realización adicional de este aspecto, la composición tiene un pH en el intervalo de 7,10-7,25, preferentemente de aproximadamente 7,15, antes del autoclavado. Además la composición tiene preferentemente una osmolaridad de 320-345 mOsm, tal como 320-330 mOsm. El diámetro promedio de las partículas de sílice recubiertas con silano puede ser de 10-1000 nm, preferentemente 10-100 nm.
- En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para preparar espermatozoides a partir de una muestra de semen de un animal no humano como se define por la reivindicación 2, que comprende la etapa de
- 15 separar los espermatozoides de los otros constituyentes del semen por centrifugación a través de una sola capa de una formulación coloidal, en el que la formulación coloidal es una composición de acuerdo con la reivindicación 1.
- El procedimiento hace uso de la composición de acuerdo con el primer aspecto.
- En una realización de este aspecto, la densidad de la formulación coloidal está en el intervalo de 1,05-1,14 g/ml, tal como 1,051-1,11 g/ml. La formulación puede tener un pH de 6,8-7,4, preferentemente 7,0-7,3 y tiene una
- 20 osmolaridad de 320-330 mOsm.
- En una realización de este aspecto, el procedimiento se lleva a cabo en un recipiente que no es de plástico, tal como un recipiente de vidrio.
- En una realización de este aspecto, el procedimiento se lleva a cabo en recipientes con un volumen de 10 ml o superior a 10 ml, tal como 50-200 ml. La altura de la formulación coloidal en el recipiente puede ser de 30-45 mm.
- 25 En una realización de este aspecto, se procesa el eyaculado completo.
- En una realización de este aspecto, el animal es un ave o un mamífero, tal como un caballo, un toro, un cerdo o un perro.
- En una realización de este aspecto, el diámetro promedio de las partículas de sílice recubiertas con silano es de 10-1000 nm, preferentemente 10-100 nm.
- 30 En una realización de este aspecto, la muestra de semen no es oligospermica.
- En una realización de este aspecto, los espermatozoides se separan del plasma seminal y los componentes celulares y no celulares del plasma seminal, tales como bacterias, virus, leucocitos, partículas, etcétera. Cada componente separado puede usarse por separado.
- En una realización de este aspecto, el procedimiento se usa para prolongar la duración de la motilidad del esperma. Esto se describe con mayor detalle en los ejemplos más adelante.
- 35 En una realización de este aspecto, el procedimiento se usa para reducir la variación en la calidad del esperma entre los eyaculados. Esto se describe con mayor detalle en los ejemplos más adelante.
- Las diferentes realizaciones del procedimiento de acuerdo con este aspecto pueden combinarse entre sí.
- En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para separar una subpoblación de esperma de interés a partir de una muestra de semen de un animal no humano como se define en la reivindicación 10 que comprende las etapas
- 40 proporcionar un gradiente de densidad que comprende al menos dos capas de la composición de acuerdo con el primer aspecto, teniendo cada capa una densidad diferente;
- 45 separar las subpoblaciones de esperma en la muestra de semen por centrifugación a través del gradiente de densidad; y
- seleccionar la subpoblación de esperma de interés.
- La subpoblación de esperma puede comprender, por ejemplo, espermatozoides haploides o espermatozoides que tienen una motilidad normal, por ejemplo, de origen equino, bovino o porcino.
- También se desvelan espermatozoides preparados con el procedimiento de acuerdo con la invención y el uso de dichos espermatozoides en AI, IVF e ICSI.
- 50

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Efecto del uso de esperma fresco o almacenado para la centrifugación coloidal sobre la supervivencia de esperma de caballo (n = 12). Nota: día de recolección = Día 1; por lo tanto, Día 2 = 24 horas, Día 3 = 48 horas, etcétera.

5 **Figura 2:** Efecto del lavado (n = 38) o el uso del sedimento de esperma sin lavar (n = 38) después de la centrifugación en una sola capa sobre las estimaciones de motilidad subjetivas promedio (%).

Figura 3: Efecto de la osmolaridad del coloide sobre la proporción de espermatozoides de caballo con morfología normal después de la centrifugación coloidal (n = 15).

Figura 4: Efecto de la osmolaridad del coloide sobre los defectos de la cromatina del esperma (n = 12).

10 **Figura 5:** Efecto de la separación de los espermatozoides del plasma seminal sin la selección concomitante de los espermatozoides de buena calidad usando la densidad del coloide (n = 3).

Figura 6: Comparación de los coloides de distinta densidad (80 % y 60 %) usados para la centrifugación en una sola capa (n = 8).

15 **Figura 7:** Efecto del aumento de la escala de la centrifugación en una sola capa sobre el rendimiento de espermatozoides de caballo: control (4 ml de coloide más 1,5 ml de eyaculado extendido), con un índice de 1 para cada tratamiento.

Figura 8: Motilidad subjetiva en muestras de esperma antes y después de la centrifugación en una sola capa, donde se comparan tratamientos pequeños (4,0 ml de coloide más 1,5 ml de eyaculado extendido) y grandes (20 ml de coloide y 7,5 ml de eyaculado extendido) (n = 8).

20 **Figura 9:** Motilidad subjetiva en muestras de esperma antes y después de la centrifugación en una sola capa, donde se comparan tratamientos pequeños (4,0 ml de coloide más 1,5 ml de eyaculado extendido) y extra-grandes (60 ml de coloide y 22,5 ml de eyaculado extendido) (n = 4).

Figura 10: Efecto del aumento de la escala de la centrifugación coloidal sobre la viabilidad del esperma de caballo (n = 8).

25 **Figura 11:** Efecto del aumento de la escala de la centrifugación coloidal sobre la motilidad del esperma de caballo (n = 7).

Figura 12: Efecto del aumento de la escala de la centrifugación coloidal sobre la velocidad del esperma de caballo (n = 7).

30 **Figura 13:** Efecto del aumento del volumen del coloide y el volumen del eyaculado sobre la motilidad del esperma de caballo (n = 9).

Figura 14: Efecto de la osmolaridad del coloide sobre la motilidad del esperma de jabalí después de la centrifugación con gradiente de densidad en tubos de centrífuga pequeños y grandes: osmolaridad = 305 mOsm (n = 4). Nota: el día 1 es el día de la preparación; el día 2 representa el transcurso de 24 horas, etcétera.

35 **Figura 15:** Efecto de osmolaridad del coloide sobre la motilidad del esperma de jabalí después de la centrifugación con gradiente de densidad en tubos de centrífuga pequeños y grandes: osmolaridad = 330 mOsm (n = 8). Nota: el día 1 es el día de la preparación; el día 2 representa el transcurso de 24 horas, etcétera.

Figura 16: Comparación de la centrifugación con gradiente de densidad y la centrifugación en una sola capa de espermatozoides de jabalí (n = 12 eyaculados). Nota: el día 1 es el día de la preparación; el día 2 representa el transcurso de 24 horas, etcétera.

40 **Figura 17:** Efecto de la incubación a 37 °C sobre la motilidad de espermatozoides de jabalí de preparaciones de una sola capa (n = 18 eyaculados).

Figura 18: Comparación de la centrifugación coloidal con el uso de espermatozoides de jabalí frescos y almacenados (n = 12 eyaculados).

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención tiene por objeto mejorar las composiciones y los procedimientos de los antecedentes técnicos para preparar espermatozoides a partir de eyaculados de animales, con relación su calidad y también su simplicidad de preparación. La mejora en la calidad del esperma incluye la prolongación de la supervivencia del esperma, la mejora de la motilidad, la viabilidad y la morfología del esperma, la integridad de la cromatina, y la capacidad de congelamiento. Las mejoras de los procedimientos incluyen un mayor rendimiento y una mayor facilidad de
50 operación, la capacidad de procesar grandes volúmenes de eyaculado, seleccionar subpoblaciones de esperma y

realizar una optimización para especies individuales. Esto se describe con mayor detalle en los ejemplos.

La composición de acuerdo con la invención puede producirse como una composición madre. Esta composición madre tiene una densidad de aproximadamente 1,14 g/ml. Esta composición madre puede usarse sin diluir en determinadas aplicaciones, pero también puede diluirse con un tampón apropiado. Las diluciones apropiadas incluyen, por ejemplo, 80 %, 70 %, 67,5 %, 65 %, 60 % y 40 % de la composición madre. Por supuesto, estas composiciones diluidas también pueden prepararse de manera directa, sin producir primero una composición madre.

Las partículas de sílice recubiertas con silano usadas pueden ser un producto disponible en el mercado, tal como RediGrad, disponible en GE Healthcare, o cualquier otra composición de partículas con características comparables.

Se describen algunos ejemplos de composiciones de acuerdo con la invención como la Composición madre A (apropiada para usar con especies porcinas) y la Composición madre E (apropiada para otras especies, tales como especies equinas, bovinas o caninas) en la Tabla I a continuación. El tampón E y el tampón A pueden usarse para preparar las composiciones diluidas correspondientes, pero también pueden usarse otros tampones. A modo de ejemplo, el tampón A puede reemplazarse por solución de descongelamiento Beltsville (BTS) en la dilución de la Composición madre A. El pH de las composiciones madre descritas a modo de ejemplo es de aproximadamente 7,15, pero su valor aumenta durante el autoclavado hasta aproximadamente 7,33.

Tabla I

Sustancia química	Composición madre E mM	Composición madre A mM	Tampón E mM	Tampón A mM	E al 80 % mM	A al 80 % mM
NaCl	104	113	135	121	115	113
KCl	4,3	4,7	5,5	5,0	4,7	4,7
Glucosa	1,1	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2
EDTA	0,11	0,13	0,13	0,12	0,13	0,13
HEPES	16	18	18	19	18	18
CaCl ₂	2,5	2,7	0	0	0	2,7
Citrato de Na			7,6	8,1	5,8	1,6
Lactato de Ca			3,0		2,5	0
Lactato de Na				19		3,8
H ₂ O*			1 l	1 l	0,2 l	0,2 l
RediGrad	1 l	1 l			0,8 l	0,8 l
Densidad	1,13 ± 0,005 g/ml					
Osm	320	330	320	330	320	330
pH	7,15-7,35	7,15-7,35			7,15	7,15
*con calidad de agua para inyección						

Se necesita un procedimiento para prolongar la vida útil de los espermatozoides de caballo destinados a la AI. Los presentes inventores compararon la centrifugación con gradiente de densidad o la centrifugación a través de una sola capa de coloide como procedimientos potenciales para preparar espermatozoides de caballo. Ambos procedimientos parecieron prolongar la duración de la motilidad del esperma en comparación con los espermatozoides sin centrifugar ($P < 0,001$), con lo que potencialmente se extendería la vida útil de los espermatozoides de caballo tratados para la AI. Además, se realizó una comparación de la eficacia de la selección usando (i) semen de caballo recién recolectado y extendido, y (ii) muestras de semen almacenadas durante la noche a 4 °C antes de los procedimientos.

Para el semen fresco y extendido, se observó un rendimiento de recuperación de espermatozoides con motilidad similar con los dos procedimientos de preparación (27,0 ± 6,56 millones de espermatozoides 32,6 ± 7,79 para las centrifugaciones en una sola capa y con gradiente de densidad, respectivamente). Sin embargo, el rendimiento se redujo aproximadamente 18-20 % cuando se usó semen almacenado en frío para la centrifugación, en comparación con el semen fresco, y se observó una mayor variación entre los eyaculados para los eyaculados frescos. Nuevamente, la motilidad del esperma y la supervivencia del esperma mejoraron en las preparaciones de esperma centrifugadas, en comparación con los eyaculados almacenados sin procesar. Se concluyó que las dos técnicas de centrifugación coloidal producían preparaciones de esperma equivalentes, y que el procedimiento en una sola capa sería conveniente para usar en el campo. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 1.

La morfología del espermatozoide y la integridad de la cromatina han sido relacionadas con la fertilidad de los espermatozoides de caballo. En estudios previos con eyaculados humanos, se demostró que la proporción de espermatozoides con morfología normal y cromatina intacta puede aumentarse usando una centrifugación con gradiente de densidad (6). Los presentes inventores investigaron si esta metodología podía ser efectiva para el semen de caballo, mediante el uso de centrifugación con gradiente de densidad o el nuevo procedimiento mencionado con anterioridad, la centrifugación en una sola capa. Hubo un aumento significativo en la proporción de espermatozoides con morfología normal en las preparaciones de espermatozoides después de la centrifugación coloidal, independientemente de cuál procedimiento de centrifugación había sido usado (antes de la centrifugación: $67,5 \pm 13,06$ %; después de una centrifugación en una sola capa: $77,1 \pm 9,3$ %; después de una centrifugación con gradiente de densidad: $76,7 \pm 8,7$ %; $P < 0,001$). Más aún, la variación entre los caballos se redujo considerablemente con la centrifugación. Algunas de las anomalías morfológicas se vieron considerablemente reducidas después de la centrifugación coloidal, por ejemplo, la incidencia de gotas citoplásmicas proximales se redujo 20 %, y la incidencia de gotas citoplásmicas distales se redujo 50 %, mientras que la centrifugación coloidal tuvo un impacto escaso sobre las proporciones de cabezas angostas o en forma de pera presentes. En general, estos resultados sugieren que la centrifugación coloidal es un procedimiento apropiado para cosechar espermatozoides con morfología normal a partir de los eyaculados que han de usarse para la AI, y además, puede reducir algunas de las variaciones observadas entre los caballos. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 1.

Además, ambos procedimientos de centrifugación coloidal proporcionaron preparaciones de espermatozoides donde la integridad de la cromatina se vio significativamente mejorada (índice de fragmentación del ADN en preparaciones no seleccionadas: $11,0 \pm 4,6$; centrifugación en una sola capa: $4,8 \pm 2,6$; centrifugación con gradiente de densidad: $4,8 \pm 2,8$; $P < 0,001$). No hubo diferencias entre los dos procedimientos de centrifugación. Además, hubo relaciones negativas entre la morfología normal y el índice de fragmentación del ADN (DFI) ($P < 0,001$), la morfología normal y la desviación estándar del DFI (SD_DFI), ($P < 0,001$), y el DFI y la tasa de preñez ($P < 0,03$). Para los defectos específicos, hubo una relación directa entre la incidencia de cabezas en forma de pera y el DFI ($P < 0,05$), las cavidades nucleares y el DFI ($P < 0,001$), y el defecto en la porción media y el DFI ($P < 0,01$); entre las cabezas separadas y la SD_DFI ($P < 0,001$), y entre las cabezas separadas y el DFI promedio ($P < 0,05$). En conclusión, la centrifugación en una sola capa fue tan efectiva como la centrifugación con gradiente de densidad para enriquecer las preparaciones de espermatozoides de caballo en espermatozoides con estructuras de cromatina normales, por lo que puede ayudar a mejorar las tasas de preñez para la inseminación artificial. La presencia de determinados defectos morfológicos puede ser indicativa de daño en la cromatina, por lo que podría usarse como marcador para predecir la fertilidad de las dosis de inseminación. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 1. El uso de centrifugación coloidal para preparar espermatozoides de animales para la AI dependerá del procesamiento de grandes volúmenes de eyaculados o grandes cantidades de espermatozoides. Los procedimientos para aumentar el volumen del eyaculado que pueden usarse para reducir las pérdidas durante la centrifugación se investigaron alterando parámetros tales como la osmolaridad y la densidad de la formulación coloidal, y usando tubos de centrífuga de distintos materiales (vidrio frente a plástico) y tamaños (10 frente a 50 ml). La reducción de la densidad del coloide usado para la centrifugación en una sola capa permitió aumentar sustancialmente la proporción de espermatozoides con motilidad en comparación con el coloide de densidad normal (promedio $\pm$ SD: $72,6 \pm 28,9$ millones en comparación con $28,9 \pm 24,7$ millones), al tiempo que también permitió prolongar la supervivencia del espermatozoide en 24 horas en comparación con el eyaculado sin centrifugar. El uso de tubos de vidrio en lugar de tubos de plástico permitió aumentar significativamente el rendimiento promedio ($42,2 \pm 22,14$ millones y $39,3 \pm 19,87$ millones de espermatozoides para el vidrio y el plástico, respectivamente; $P < 0,01$). El uso de tubos de centrífuga grandes (50 ml) junto con volúmenes aumentados de coloides y semen ("aumento de la escala") produjo resultados variables, probablemente debido a las diferencias entre los eyaculados. Sin embargo, volúmenes de 8-10 ml de coloide (en una o dos capas) junto con 4,5 ml de semen extendido en tubos de 50 ml proporcionaron los mayores rendimientos, en comparación con los volúmenes usuales en tubos de 10 ml, lo que indica que debería ser posible recuperar suficientes cantidades de espermatozoides para la AI. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 3.

En una comparación de formulaciones coloidales con dos osmolaridades diferentes, "normal" (320 mOsm) y "alta" (345 mOsm), los rendimientos promedio para la centrifugación en una sola capa fueron de $30,19 (\pm 16,9)$ y $25,8 (\pm 18,5)$ millones de espermatozoides para cada osmolaridad, respectivamente, mientras que los rendimientos para la centrifugación con gradiente de densidad fueron de $31,84 (\pm 19,7)$ y $26,46 (\pm 20,0)$ millones de espermatozoides, respectivamente, con una variación considerable entre los eyaculados. Estas diferencias no son de significación estadística. Sin embargo, el uso de un coloide de mayor osmolaridad para la centrifugación en una sola capa resultó en un aumento en la cantidad de espermatozoides con morfología normal en la preparación ($P < 0,001$). Además, esta tendencia también se observó para las centrifugaciones con gradientes de densidad, aunque la diferencia no tuvo una significación estadística tan marcada ($P < 0,051$). Para las anomalías morfológicas individuales, las diferencias en la capacidad de las formulaciones coloidales de osmolaridad normal y alta de eliminar los espermatozoides anormales no fueron significativas. Entonces, el aumento de la osmolaridad de la formulación coloidal puede ser beneficioso para procesar eyaculados que contienen una proporción elevada de espermatozoides anormales. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 3.

En un ejemplo adicional, el procedimiento de centrifugación coloidal en una sola capa se modificó para acelerar el proceso, y se incrementó la escala para permitir el procesamiento del eyaculado completo, que es voluminoso en los

caballos, en una pequeña cantidad de tubos grandes. La omisión del segundo paso de "lavado" posterior a la centrifugación en el protocolo original resultó en un ahorro de tiempo considerable y no afectó de manera adversa la motilidad del esperma. Para el aumento de la escala, el uso de entre 8 y 12,5 ml de coloide (80 %) con 5 ml de eyaculado no resultó en preparaciones de esperma con una motilidad tan buena como el uso de 4 ml de coloide en tubos de centrifuga de 10 ml. Sin embargo, cuando se usaron 15 o 20 ml de coloide de diversas densidades (60-80 %) para centrifugar 7,5 ml de eyaculado extendido en tubos de centrifuga de 50 ml, se obtuvieron preparaciones de esperma cuya calidad se consideró equivalente a la de las preparaciones de tamaño normal. Se descubrió que 15 ml de coloide al 60 % proporcionaban las mejores preparaciones de esperma en términos de rendimiento de esperma y supervivencia del esperma. La motilidad del esperma no fue diferente entre los tratamientos. Además, el uso de 60 ml de coloide (80 %) con 22,5 ml de eyaculado extendido en tubos de centrifuga de 200 ml proporcionó preparaciones de esperma cuya motilidad y duración de supervivencia se consideraron similares a las de las preparaciones de esperma realizadas con 4 ml de coloide en tubos de centrifuga de 10 ml. Finalmente, los espermatozoides preparados fueron capaces de realizar la fertilización, ya que se obtuvieron individuos preñados después de llevar a cabo una inseminación con los espermatozoides enfriados, transportados y centrifugados. Este aumento de la escala se describe con mayor detalle en el ejemplo 4.

La capacidad de fertilización de los espermatozoides congelados-descongelados seleccionados se evaluó usando fertilización in vitro (IVF), donde los espermatozoides se prepararon en un gradiente de densidad o en una sola capa de coloide. La tasa de fertilización promedio, la tasa de desarrollo de blastocistos y la cantidad total de células fueron $56,3 \pm 23,3$ %, $23,5 \pm 17,4$ % y $83,2 \pm 29,9$ %, respectivamente, para los espermatozoides con un gradiente de densidad, y $58,1 \pm 23,3$ %, $24,5 \pm 14,3$ % y $94,6 \pm 23,4$ %, respectivamente, para los espermatozoides preparados en una sola capa de coloide. Los valores promedio de los diversos parámetros de los análisis computarizados de la motilidad del esperma no fueron diferentes entre los dos procedimientos usados para preparar el esperma. Estos resultados confirman lo informado para el caballo y el jabalí, a saber, que los espermatozoides preparados en una sola capa de coloide no tienen un comportamiento o propiedades diferentes de los espermatozoides preparados con un gradiente, y además, indican que no hay diferencias en las capacidades de fertilización del esperma en estos dos tipos de preparaciones. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 6.

La centrifugación coloidal había sido usada con anterioridad para seleccionar espermatozoides con morfología normal. Dentro del marco de la presente invención, se intentó seleccionar espermatozoides de tamaño normal a partir de una población polimórfica en un eyaculado de toro. Se usaron capas individuales de coloides de distintas densidades para identificar las densidades apropiadas para el gradiente de densidad. Usando coloides con densidades de 55 % y 70 %, fue posible obtener dos subpoblaciones de esperma: una que contenía casi por completo espermatozoides de tamaño normal, y otra enriquecida en espermatozoides macrocefálicos. Los espermatozoides microcefálicos fueron eliminados en el coloide de menor densidad, por lo que no aparecieron en ninguna de las subpoblaciones seleccionadas. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 5.

Los obstáculos para el uso de la centrifugación con gradiente de densidad en otras especies, tales como el jabalí, son similares a los mencionados para el caballo. Los presentes inventores investigaron los siguientes: (i) el efecto del aumento de la osmolaridad de una formulación coloidal sobre la eficacia de la selección del esperma de jabalí durante la centrifugación con gradiente de densidad, con el objeto de desarrollar formulaciones coloidales específicas para espermatozoides de animales, (ii) una comparación de la centrifugación con gradiente de densidad con la centrifugación en una sola capa de coloide para preparar espermatozoides de jabalí, (iii) el efecto del autoclavado del coloide sobre los espermatozoides de jabalí, y (iv) el lavado de los espermatozoides después de la centrifugación coloidal.

Los resultados demostraron que el aumento de la osmolaridad del coloide usado para la centrifugación con gradiente de densidad de los espermatozoides de jabalí incrementó la proporción de espermatozoides con motilidad en la preparación de esperma resultante. Además, la motilidad del esperma se mantuvo al menos 24 horas más en las preparaciones de esperma centrifugadas que en los controles (alícuotas sin centrifugar), es decir, 7 u 8 días para los centrifugados en un gradiente de densidad, en comparación con menos de 6 días para los espermatozoides sin centrifugar. Para la comparación de las centrifugaciones en una sola capa de coloide y con gradiente de densidad, la motilidad del esperma fue significativamente mejor ($P < 0,001$) en las preparaciones de esperma centrifugadas (promedios $\pm$ desviaciones estándar: $79,6 \pm 8,1$ % y $74,2 \pm 12,0$ % para las centrifugaciones en una sola capa y con gradiente de densidad, respectivamente) que en los controles sin centrifugar ($62,9 \pm 12,7$ %). El rendimiento promedio de espermatozoides con motilidad para la centrifugación en una sola capa fue de $67,5 \pm 25,6$ %, y para la centrifugación con gradiente de densidad, $59,6 \pm 22,3$ % (ns). La supervivencia aumentó significativamente al efectuar la centrifugación coloidal (preparaciones sin centrifugar: $3,1 \pm 0,3$ días, SL: $5,5 \pm 0,79$ días, DG: $5,75 \pm 0,62$ días; $P < 0,001$ para las preparaciones sin centrifugar frente a las preparaciones centrifugadas; SL frente a DG: ns). La presencia de bacterias en las muestras de esperma sin centrifugar puede haber contribuido a la muerte de los espermatozoides. La centrifugación coloidal pareció eliminar las bacterias.

El autoclavado de la formulación coloidal no tuvo efecto alguno sobre la cantidad de esperma, la motilidad del esperma o la supervivencia del esperma, en comparación con el autoclavado del coloide. Además, el lavado del sedimento de esperma obtenido después de la centrifugación coloidal frente al uso del sedimento de esperma sin lavar no tuvo efecto alguno sobre la cantidad de esperma, la motilidad del esperma o la supervivencia del esperma. Fue posible almacenar los espermatozoides de jabalí durante 24 horas antes de la centrifugación, sin que esto

tuviera un efecto perjudicial sobre la motilidad del espermatozoide y la duración de la motilidad en las preparaciones centrifugadas. En conclusión, el aumento de la osmolaridad de la formulación coloidal mejora la selección de los espermatozoides durante la centrifugación con gradiente de densidad. En conclusión, la centrifugación en una sola capa de coloide produce preparaciones de espermatozoides que tienen una motilidad y un rendimiento similares a los que pueden obtenerse con un gradiente de densidad, y estas preparaciones presentan una motilidad del espermatozoide y una duración de la supervivencia mejoradas en comparación con las muestras de espermatozoides control (sin centrifugar). El procedimiento en una sola capa puede facilitar el desarrollo de un procedimiento a mayor escala para preparar grandes volúmenes de eyaculado. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 6.

Los presentes inventores investigaron el uso de SLC para preparar espermatozoides de perro para la AI, comparando la motilidad y la morfología del espermatozoide en muestras de espermatozoides no seleccionados y seleccionados. La motilidad del espermatozoide promedio aumentó desde $77,2 \pm 19,6$ % antes de la SLC hasta $87,6 \pm 2,7$ % después de la SLC, mientras que la motilidad progresiva promedio aumentó desde $48,6 \pm 18$ % hasta $67,9 \pm 11$ %. La morfología normal promedio fue de $62,2 \pm 42,8$ en las muestras no seleccionadas y de $82,5 \pm 19,1$ % en las muestras seleccionadas por SLC. Después de un almacenamiento durante 7 días a 4°C , la motilidad del espermatozoide fue <5 % en las muestras de espermatozoides no seleccionados y de $57 \pm 11,3$ % en las preparaciones de espermatozoides seleccionados por SLC. El rendimiento de espermatozoides varió entre 12 y 47 %, dependiendo de la calidad del espermatozoide en el eyaculado original. Conclusión: Estos resultados preliminares indican que la SLC puede ser un procedimiento útil para mejorar la calidad del espermatozoide de perro en las dosis de espermatozoides que han de usarse en la AI. Esto se describe con mayor detalle en el ejemplo 7.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos se describen con mayor detalle algunas realizaciones específicas de la invención. Estos ejemplos no han de considerarse como limitativos y el ámbito de la invención es el de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: caballo

Objetos: (i) comparar la centrifugación en una sola capa (SLC) y la centrifugación con gradiente de densidad (DGC) con relación a la calidad del espermatozoide de caballo, en términos de motilidad del espermatozoide, rendimiento, morfología del espermatozoide e integridad de la cromatina, y supervivencia (retención de la motilidad), usando semen de caballo recién recolectado; (ii) comparar la calidad del espermatozoide después de la centrifugación coloidal de semen de caballo fresco y almacenado.

Procedimientos: se recolectó semen de 10 caballos en tacos de AI comerciales usando procedimientos convencionales. Los eyaculados se extendieron usando extensores de semen preparados especialmente o disponibles en el mercado (extensor de Kenney [7], INRA 96 [IMV, France]) calentados a 37°C , y la concentración de espermatozoides se ajustó en aproximadamente $100 \times 10^6/\text{ml}$. Se usaron alícuotas de 38 eyaculados para la DGC y la SLC como se indica a continuación: se preparó un gradiente de densidad pipeteando 2 ml de coloide E al 80 % en un tubo de centrifuga y aplicando cuidadosamente 2 ml de la capa de menor densidad en la parte superior; se pipeteó una alícuota (1,5 ml) de semen extendido en la parte superior de la capa superior del coloide. El gradiente se centrifugó a $300 \times G$ durante 20 minutos, después de lo cual se descartó el sobrenadante y la mayoría del material del gradiente. El sedimento de espermatozoides se transfirió a un tubo de centrifuga limpio que contenía 5 ml de extensor de Kenney y se lavó realizando una centrifugación durante 10 minutos a $500 \times G$. Después del lavado, el sedimento de espermatozoides se suspendió nuevamente en extensor de Kenney fresco (1 ml). Para la SLC, el procedimiento fue similar al de la DGC, con la excepción de que se colocaron 4 ml de coloide E al 80 % en el tubo de centrifuga en lugar de dos capas con densidades diferentes (2 ml de cada densidad).

La calidad del espermatozoide en las muestras de espermatozoides no seleccionados y centrifugados se evaluó como se indica a continuación: evaluación de la motilidad subjetiva, la morfología del espermatozoide (8, 9) y la integridad de la cromatina usando el procedimiento de Evenson y col. (10) modificado por Januskauskas y col. (11, 12).

Para la evaluación de la motilidad subjetiva, se examinaron alícuotas ($0,5 \mu\text{l}$) del eyaculado extendido y las preparaciones de espermatozoides con microscopía óptica de contraste de fases ($\times 200$) inmediatamente después de la preparación, en una platina de microscopio caliente (38°C) y una vez por día, hasta que la motilidad hubo disminuido hasta aproximadamente 20 %. Las preparaciones de espermatozoides se almacenaron en el refrigerador (6°C) o a temperatura ambiente ($22-30^\circ\text{C}$). Cuando se evaluó la motilidad de los espermatozoides que habían sido almacenados a 6°C , las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de tomar las alícuotas para evaluar la motilidad.

En el segundo experimento, se almacenaron eyaculados extendidos ($n = 21$) durante la noche en una caja de transporte aislada que contenía paquetes refrigerantes, es decir, usando el procedimiento convencional para transportar semen de caballo. Se realizaron centrifugaciones con gradiente de densidad o en una sola capa al día siguiente, usando el semen extendido almacenado, y se realizaron estimaciones de la motilidad en las preparaciones de espermatozoides obtenidas con eyaculados frescos y almacenados.

Resultados: cuando se usó semen fresco extendido para la centrifugación coloidal, las proporciones de espermatozoides con motilidad, espermatozoides con morfología normal y espermatozoides con cromatina intacta

fueron similares para los dos procedimientos de centrifugación. Estos parámetros de calidad del esperma obtenidos con cada procedimiento de centrifugación coloidal fueron mejores que en las muestras sin centrifugar (Tabla 1), y la duración de la supervivencia del esperma se vio significativamente mejorada, ya que varió entre 4 días 10 días a 6 °C, y entre 2 y 6 días a temperatura ambiente.

5 **Tabla 1: Efecto de la centrifugación en una sola capa y la centrifugación con gradiente de densidad sobre la calidad del esperma de caballo, promedio $\pm$ SD (n = 38).**

Parámetro	Control sin centrifugar	Después de la centrifugación coloidal	
		En una sola capa	Con gradiente de densidad
Motilidad (%)	68,0 $\pm$ 9,2	84,7 $\pm$ 5,4 ^{a b}	84,3 $\pm$ 5,9 ^{a b}
Rendimiento		27,0 $\pm$ 6,6 ^b	32,6 $\pm$ 7,8 ^b
Supervivencia a 4 °C (días)	2,4 $\pm$ 1,3 Intervalo 1-5	5,6 $\pm$ 1,8 ^{a b} Intervalo 3-9	5,7 $\pm$ 1,9 ^{a b} Intervalo 3-10
Supervivencia a temperatura ambiente (días)	2,1 $\pm$ 0,7 Intervalo 1-3	3,0 $\pm$ 0,9 ^{a b} Intervalo 2-6	3,1 $\pm$ 0,9 ^{a b} Intervalo 2-5
Morfología normal (%)	67,5 $\pm$ 13,0	77,1 $\pm$ 9,3 ^{a b}	76,7 $\pm$ 8,7 ^{a b}
Daño en la cromatina (%)	11,0 $\pm$ 4,6	4,8 $\pm$ 2,6 ^{a b}	4,8 $\pm$ 2,8 ^{a b}

^a diferencia significativa después de la centrifugación; ^b sin diferencias entre los procedimientos.

10 Cuando se usó semen almacenado en frío para la centrifugación, el rendimiento se redujo 18-20 % en comparación con el semen fresco, y se observó más variación entre los eyaculados que con los eyaculados frescos. Nuevamente, la motilidad del esperma y la supervivencia del esperma fueron mejores en las preparaciones de esperma centrifugadas en comparación con los eyaculados almacenados sin procesar (Figura 1).

15 **Conclusiones:** las dos técnicas de centrifugación coloidal producen preparaciones de esperma equivalentes, con una calidad de esperma mejorada en comparación con las muestras control sin centrifugar. La SLC o la DGC podrían efectuarse con semen almacenado y también con semen fresco, aunque la calidad del esperma en las preparaciones de esperma resultantes fue mejor cuando se usó semen fresco. Como la SLC es más simple y se realiza más rápidamente que la DGC, sería más conveniente para usar en el campo.

Ejemplo 2: caballo

20 **Objetos:** (i) investigar los cambios en la motilidad y la viabilidad del esperma, y la integridad de la cromatina producidos por el almacenamiento después de la centrifugación coloidal; (ii) investigar la necesidad de lavar el sedimento de esperma con un análisis de datos retrospectivos.

25 **Procedimientos:** se recolectó semen de 4 caballos en tacos de AI comerciales usando procedimientos convencionales. Los eyaculados se extendieron usando extensores de semen preparados especialmente o disponibles en el mercado (extensor de Kenney, INRA 96) calentados a 37 °C, y la concentración de esperma se ajustó en aproximadamente 100 $\times$ 10⁶/ml. Se usaron alícuotas de estos eyaculados para la SLC como se describió con anterioridad, usando 1,5 ml de eyaculado extendido aplicado sobre 4 ml de coloide (80 %). El sedimento de esperma no se lavó. La calidad del esperma (motilidad del esperma, viabilidad del esperma, integridad de la membrana e integridad de la cromatina) se evaluó en las muestras preparadas por SLC y las muestras control sin centrifugar, inmediatamente y después de 24 y 48 horas. Los procedimientos son como los que se describieron en el Ejemplo 1, con la adición del procedimiento para el análisis computarizado de la motilidad del esperma (CASA) (13), la viabilidad del esperma y la integridad de la membrana (14). Las preparaciones de esperma se almacenaron en el refrigerador (6 °C). Cuando se evaluó la motilidad de los espermatozoides que habían sido almacenados a 6 °C, las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de realizar la evaluación.

35 Para el análisis retrospectivo, se realizó una comparación de los datos de motilidad subjetiva de los 38 eyaculados preparados por centrifugación en una sola capa, con el lavado subsiguiente del sedimento de esperma, y 39 eyaculados donde no se lavó el sedimento de esperma después de la centrifugación en una sola capa.

Resultados: hubo un deterioro rápido en la motilidad del esperma en las muestras sin centrifugar a las 48 horas, acompañado por una disminución en la viabilidad del esperma, la integridad de la membrana y la integridad de la cromatina. En contraste, en las muestras preparadas por SLC, todos estos parámetros de calidad del esperma fueron mejores que en las muestras sin centrifugar y se mantuvieron durante 48 horas (Tablas 2-5).

Tabla 2: Parámetros de motilidad (subjettiva y CASA) de las muestras de esperma antes de la centrifugación coloidal, inmediatamente después de la centrifugación coloidal y 24 horas y 48 horas después de la centrifugación coloidal con un almacenamiento a 5 °C (10 eyaculados).

Muestra	Tiempo	Motilidad subjettiva	Motilidad total CASA	Mot. c	Mot. no l.	Mot. l
Sin centrifugar	0	64 ± 3,9	72,11 ± 13,1	2,26 ± 0,93	46,7 ± 14,4	34,8 ± 22,9
	+ 24	31,5 ± 15,1	33,3 ± 19,4	4,77 ± 5,4	59,95 ± 9,4	9,69 ± 8,6
	+ 48	10 ± 6,6	12,1 ± 12,2	1,97 ± 2,4	45,9 ± 21,3	10,3 ± 12,4
Centrifugadas	0	77 ± 7,5	85,7 ± 9,0	5,6 ± 3,6	27,1 ± 14,3	59 ± 18,1
	+ 24	72,5 ± 18,7	71,3 ± 2,34	12,25 ± 6,2	31,0 ± 22,0	49,8 ± 23,1
	+ 48	48,5 ± 14,9	61,7 ± 2,7	10,97 ± 4,9	38,31 ± 25,0	44,68 ± 23,2

Nota: motilidad CASA = población mótil total de acuerdo con CASA; mot. c = motilidad circular; mot. no l = motilidad no lineal; mot. l = motilidad lineal progresiva.

1) Motilidad subjettiva: las muestras centrifugadas tuvieron una motilidad significativamente mayor que las muestras no centrifugadas en todos los puntos de tiempo ($P < 0,001$).

2) CASA: Las muestras centrifugadas tuvieron una motilidad mayor que las muestras sin centrifugar en todos los puntos de tiempo (0 horas, $P < 0,05$, 24 y 48 horas, $P < 0,001$); los valores de mot. c y mot. l fueron significativamente mayores para las muestras centrifugadas que para las muestras sin centrifugar en todos los puntos de tiempo, mientras que los valores de mot. no l fueron significativamente menores ($P < 0,05$).

5 Tabla 3: Efecto del almacenamiento a 5 °C sobre la viabilidad del esperma (coloración SYBR-14/PI) en el tiempo en muestras de esperma no seleccionadas y seleccionadas por SLC (n = 10).

	No seleccionadas			Seleccionadas por SLC		
	vivos	mueritos	moribundos	vivos	mueritos	moribundos
0	64,7 ± 9,3 ^{b d}	27,4 ± 9,1 ^{ad}	7,9 ± 2,6 ^b	79,5 ± 9,2 ^b	16,4 ± 8,1 ^a	4,1 ± 2,0 ^b
+ 24	50,3 ± 18,3 ^{cd}	40,0 ± 20,7 ^b	10,0 ± 4,7 ^b	79,1 ± 8,8 ^c	15,9 ± 6,7 ^b	5,0 ± 2,6 ^b
+ 48	32,8 ± 10,9 ^{cd}	56,8 ± 24,8 ^{cd}	10,5 ± 6,8 ns	75,6 ± 6,8 ^c	18,5 ± 5,6 ^c	5,9 ± 2,0 ns

a, b, c = diferencia significativa entre las muestras sin centrifugar y centrifugadas, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, respectivamente.

d = diferencia significativa entre las muestras sin centrifugar en distintos puntos de tiempo, $P \leq 0,05$

Tabla 4: Cambios en la estabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de caballo con el almacenamiento a 5 °C; coloración con anexina V/ioduro de propidio (n = 10).

Tiempo	AN-/PI-		AN-/PI+		AN+/PI+		AN+/PI-	
	no seleccionadas	SLC	no seleccionadas	SLC	no seleccionadas	SLC	no seleccionadas	SLC
0	69,3 ± 8,2 ns ^b	74,6 ± 7,6 ns	23,9 ± 6,0 ^{a b}	13,4 ± 3,3 ^a	4,8 ± 3,3 ^a	9,1 ± 4,4 ^a	2,0 ± 0,4 ^{a b}	2,9 ± 0,5 ^a
24	67,1 ± 12,2 ns	74,1 ± 10,4 ns	28,7 ± 11,9 ^a	13,1 ± 2,8 ^a	2,5 ± 1,3 ^a	7,9 ± 5,6 ^a	1,7 ± 0,9 ^a	5,0 ± 3,7 ^a
48	56,6 ± 14,7 ^{a b}	74,9 ± 5,5 ^a	39,1 ± 14,7 ^{a b}	15,7 ± 4,1 ^a	3,1 ± 1,1 ^a	7,0 ± 2,9 ^a	1,3 ± 0,8 ns ^b	2,4 ± 1,5 ns

Nota: AN-/PI- = espermatozoides vivos con membranas estables; AN+/PI- = espermatozoides con membranas inestables pero intactas; AN-/PI+ y AN+/PI+ = espermatozoides con membranas dañadas. SLC = centrifugación en una sola capa

^a = diferencia significativa entre las muestras sin centrifugar y centrifugadas, $P \leq 0,05$.

^b = diferencia significativa entre las muestras sin centrifugar después de 0 horas y 48 horas, $P \leq 0,05$.

ns = no significativo

Tabla 5: Efecto del almacenamiento en la integridad de la cromatina en el tiempo en muestras de esperma no seleccionadas y seleccionadas usando el ensayo de la estructura de la cromatina del esperma (SCSA) (n = 10).

	No seleccionadas			Seleccionadas		
	DFI	DFI promedio	SD-DFI	DFI	DFI promedio	SD-DFI
0	22,1 ± 9,7 ^a	414,9 ± 34,0 ^b	23,8 ± 3,99	11,3 ± 4,9 ^a	414,9 ± 31,7 ^b	24,2 ± 3,9
+ 24	29,6 ± 10,0 ^a	413,8 ± 42 ^b	21,8 ± 3,1 ^b	14,8 ± 6,8 ^a	412,2 ± 35,2 ^b	30,5 ± 2,3 ^b
+ 48	41,1 ± 20,3 ^b	393,8 ± 45,6	21,3 ± 3,3 ^a	11,6 ± 5,3 ^b	418,6 ± 37,0	28,3 ± 3,7 ^a
^a = diferencia significativa entre las muestras sin centrifugar y centrifugadas, $P < 0,01$						
^b = diferencia significativa entre las muestras sin centrifugar y centrifugadas, $P < 0,001$.						

En la comparación retrospectiva del uso del sedimento de esperma lavado y sin lavar después de la centrifugación en una sola capa, no hubo diferencias en la motilidad subjetiva promedio de las preparaciones de esperma preparadas por SLC (Figura 2).

Conclusiones: la calidad del esperma (motilidad, viabilidad e integridad de la cromatina) en las muestras centrifugadas se mantuvo durante el almacenamiento por 48 horas, ya sea a 6 °C o a temperatura ambiente, mientras que la calidad del esperma de las muestras sin centrifugar se deterioró. El lavado del sedimento de esperma después de la centrifugación en una sola capa no es un requerimiento absoluto en términos de la calidad del esperma, por lo que esta etapa puede omitirse para ahorrar tiempo.

Ejemplo 3: caballo

Objetos: investigar el efecto de la osmolaridad y la densidad de las formulaciones coloidales sobre el rendimiento y la calidad de las muestras de esperma de caballo, y también el uso de tubos de centrifuga de distintos materiales (vidrio frente a plástico) y distintos tamaños (10 frente a 50 ml) sobre la tasa de recuperación de esperma de la centrifugación coloidal (SLC).

Procedimientos: la centrifugación coloidal se realizó como se describió con anterioridad, con las siguientes modificaciones en función de las distintas investigaciones: (i) se usaron coloides de dos osmolaridades, 320 y 345 mOsm, para la centrifugación en una sola capa y la centrifugación con gradiente de densidad de alícuotas de 15 eyaculados de caballo; (ii) se usaron coloides (4 ml) de distintas densidades para la SLC, como se indica a continuación: 40 % (densidad baja), 60 % (densidad intermedia) y 80 % (densidad convencional); (iii) se prepararon alícuotas de 7 eyaculados por SLC en tubos de centrifuga de vidrio y plástico; (iv) se realizó una comparación usando SLC o DGC en tubos pequeños (gradiente: 2+2+2,5 ml, una capa: 4+1,5 ml) y tubos grandes (gradiente: 4+4+3, 5+5+4,5, 9+9+6 y 9+9+7,5; una capa: 8+3, 8+4,5 y 12+3), cada uno en una ocasión. Las cifras hacen referencia al volumen en la capa inferior, el volumen en la capa superior (para los gradientes de densidad), o el volumen en la capa única, y el volumen del eyaculado extendido, respectivamente. Los parámetros usados para evaluar la calidad del esperma en todos estos estudios fueron la motilidad del esperma subjetiva y la tasa de recuperación (rendimiento), y también la morfología del esperma y la integridad de la cromatina para la comparación de las distintas osmolaridades, como se describió con anterioridad.

Resultados: (i): la tasa de recuperación fue algo menor para los coloides de mayor osmolaridad en comparación con aquellos de osmolaridad normal, aunque estas diferencias carecieron de significación estadística (Tabla 1). La supervivencia del esperma no se vio afectada por la osmolaridad del coloide.

Tabla 6. Efecto de la osmolaridad del coloide en el número de espermatozoides con motilidad en el sedimento después de la centrifugación en un coloide (promedio ± SD). n = 20.

305-320 mOsm		330-345 mOsm	
Una sola capa	Gradiente de densidad	Una sola capa	Gradiente de densidad
30,19 x 10 ⁶ ± 16,9	31,84 x 10 ⁶ ± 19,7	25,8 x 10 ⁶ ± 18,5	26,46 x 10 ⁶ ± 20,0

El uso de un coloide de osmolaridad alta resultó en un aumento en la cantidad de espermatozoides con morfología normal en la preparación ($P < 0,001$) (Figura 3). Además, esta tendencia también se observó para los gradientes de densidad, aunque en este caso, la diferencia no tuvo una significación estadística tan marcada ($P < 0,051$).

Sin embargo, para las anomalías morfológicas individuales, las diferencias en la capacidad de las formulaciones coloidales de osmolaridad normal y alta de eliminar los espermatozoides anormales no fueron significativas. En contraste, el uso de un coloide de osmolaridad alta para la centrifugación en una sola capa no incrementó la efectividad de la remoción de espermatozoides con cromatina dañada (Figura 4).

Resultados (ii): después de la centrifugación en una sola capa de baja densidad, las preparaciones de esperma fueron muy similares al control (semen sin centrifugar) en términos de la cantidad de espermatozoides con motilidad,

la presencia de restos celulares, etcétera. Sin embargo, la supervivencia del esperma se extendió aproximadamente 24 horas en las preparaciones centrifugadas (Figura 5). Cuando los espermatozoides se prepararon en una sola capa de densidad intermedia, las preparaciones presentaron una mayor proporción de espermatozoides con motilidad, y estos espermatozoides sobrevivieron más tiempo que los controles (alícuota sin centrifugar), aunque ningún parámetro fue tan bueno como en las muestras preparadas por centrifugación en una sola capa normal (Figura 6). La cantidad de esperma aumentó sustancialmente ($P < 0,01$) para las muestras preparadas en el coloide al 60 % en comparación con el coloide al 80 % usual (promedio $\pm$ SD: $72,6 \pm 28,9$ millones, en comparación con $28,9 \pm 24,7$ millones).

Resultados (iii): el uso de tubos de centrifuga de vidrio en lugar de tubos de centrifuga de plástico para siete eyaculados resultó en un aumento significativo ($P < 0,01$) en la cantidad de espermatozoides que aparecieron en los sedimentos. Los valores promedio fueron 42,2 millones y 39,3 millones para los tubos de vidrio y plástico, respectivamente.

Resultados (iv): hubo diferencias considerables en el rendimiento entre los eyaculados de un caballo, expresados como una proporción de la carga inicial. Los gradientes a mayor escala proporcionaron rendimientos consistentemente menores que el gradiente usual, pero dos de los volúmenes más grandes de coloide usados como capas únicas y uno de los gradientes produjeron mayores rendimientos que la capa única de tamaño usual (Figura 7). El aumento de los volúmenes sobre estos niveles no incrementó la recuperación. La proporción de espermatozoides con motilidad se redujo ligeramente en el tubo grande en comparación con el tubo pequeño (promedio 75 % frente a 80 %), independientemente de qué combinación de volúmenes se hubiera usado. La duración de la supervivencia del esperma no se vio afectada por el aumento de la escala.

Conclusiones: el rendimiento de espermatozoides de caballo obtenido después de la SLC puede aumentarse disminuyendo la densidad del coloide usado para la cromatografía en una sola capa, aunque la calidad del esperma no es tan buena como la que se obtiene cuando se usa la densidad normal. El rendimiento también puede aumentarse aumentando la escala mediante el uso de tubos de centrifuga más grande. El uso de tubos de centrifuga de vidrio en lugar de tubos de centrifuga de plástico permite aumentar ligeramente el rendimiento, pero puede no valer la pena si se tienen en cuenta los gastos que implican la compra, la limpieza y la esterilización de los tubos. El aumento de la osmolaridad de la formulación coloidal desde 320 mOsm hasta 345 mOsm resultó en una mayor proporción de esperma con morfología normal, pero no afectó la integridad de la cromatina, aunque puede reducirse el rendimiento de esperma.

Ejemplo 4: caballo

Objeto: aumentar la escala de la técnica de centrifugación coloidal para facilitar el procesamiento de eyaculados completos en el campo.

Experimentos: (i) uso del coloide al 80 % en tubos de 50 ml y tubos de 200 ml (experimento 1); (ii) investigación del efecto del cambio de la densidad del coloide (60 % por 80 %) en tubos de 50 ml (experimento 2); (iii) uso del coloide al 80 % en tubos de 10 ml, pero con un aumento del volumen de eyaculado extendido usado (experimento 3); y (iv) comparación del coloide al 80 % en tubos de 10 ml con la adición de 1,5 ml y 4,5 ml de eyaculado, y 67,5 % coloide en tubos de 50 ml con la adición de 15-18 ml de eyaculado.

Experimento 1: se transportaron alícuotas de 8 eyaculados (4 caballos, Västerbo Stuteri) al laboratorio y se las usó para la SLC como se describió con anterioridad, con la designación de preparación pequeña (1,5 ml de eyaculado extendido en 4 ml de coloide en un tubo de 10 ml) y preparación grande (7,5 ml de eyaculado extendido en 20 ml de coloide en un tubo Falcon de 50 ml). Estos volúmenes de coloide representan columnas de la misma altura en dos tipos de tubos de centrifuga. Después de la centrifugación a 300 x G durante 20 minutos, los sedimentos de esperma resultantes se suspendieron nuevamente en extensor de Kenney fresco en un tubo limpio, usando 1 ml de extensor de Kenney para el sedimento "pequeño" y 5 ml de extensor de Kenney para el sedimento "grande". La calidad del esperma se evaluó determinando la motilidad subjetiva, empleando un CASA, determinando la viabilidad del esperma (coloración con SYBR-14/PI), la integridad de la membrana (coloración con anexina-V/PI) y la integridad de la cromatina del esperma usando un SCSA, como se describió con anterioridad, en las preparaciones de esperma seleccionadas por SLC y las preparaciones de esperma no seleccionadas. La cantidad de espermatozoides en cada sedimento de esperma se usó para calcular el rendimiento. Los análisis se repitieron después de almacenamientos de 24 y 48 horas a 5 °C. Las evaluaciones de motilidad subjetivas continuaron hasta que la motilidad del esperma fue <20 %. Se usaron alícuotas de otros 4 eyaculados para la SLC, como se describió con anterioridad, con la designación de preparación pequeña (1,5 ml de eyaculado extendido en 4 ml de coloide en un tubo de 10 ml), mientras que se aplicaron 22,5 ml del mismo eyaculado en 60 ml de coloide en tubos Falcon de 200 ml, lo que se denominó preparación extra grande (SLC-XL). Los sedimentos de esperma SLC-XL se suspendieron nuevamente en 10 ml de extensor de Kenney. Se evaluó la motilidad del esperma y la duración de la supervivencia en las preparaciones de esperma pequeñas y grandes. Los procedimientos fueron como los descritos con anterioridad.

Resultados:

Motilidad del espermatozoide: la motilidad total mejoró en las preparaciones de espermatozoides seleccionadas por SLC en comparación con las preparaciones no seleccionadas, tanto de acuerdo con las estimaciones de motilidad subjetiva como usando un CASA. De acuerdo con las mediciones de motilidad subjetiva, estas diferencias fueron significativas en todos los puntos de tiempo ($P < 0,001$) y no hubo diferencias entre las preparaciones SLC-pequeña y SLC-grande (Figura 8). Se obtuvo un resultado similar para las preparaciones SLC-XL y SLC-pequeña (Figura 9).

Los resultados del CASA también demostraron que las diferencias entre las muestras de espermatozoides no seleccionadas y seleccionadas por SLC eran significativas en todos los puntos de tiempo ($P < 0,05$), aunque también hubo algunas diferencias entre las preparaciones SLC-pequeña y SLC-grande ($P < 0,05$), ya que la preparación pequeña tuvo una mejor motilidad que la preparación grande (Tabla 7). Para la motilidad circular, la motilidad no lineal y la motilidad lineal, hubo diferencias significativas entre las preparaciones de espermatozoides seleccionadas por SLC y no seleccionadas ($P < 0,05$), pero no entre las preparaciones SLC-pequeña y SLC-grande. Hubo una buena correlación entre las evaluaciones subjetivas y con un CASA para la motilidad total ($r = 0,8$, $P < 0,001$).

Tabla 7: Evaluaciones de motilidad (subjetiva y con un análisis de motilidad asistido por ordenador) para la motilidad total y diversos parámetros de motilidad de preparaciones de espermatozoides pequeñas y grandes obtenidas por centrifugación en una sola capa (promedios $\pm$ ds).

Muestra	Tiempo (horas)	Motilidad subjetiva (%)	Motilidad por CASA (%)	Motilidad circular (%)	Motilidad no lineal (%)	Motilidad lineal (%)
Preparaciones sin seleccionar	0	64 $\pm$ 3,9	72,11 $\pm$ 13,1 ^a	2,26 $\pm$ 0,93 ^{ab}	46,7 $\pm$ 14,4	34,8 $\pm$ 22,9
	+ 24	31,5 $\pm$ 15,1 ^a	33,3 $\pm$ 19,4 ^{ac}	4,77 $\pm$ 5,4 ^{ac}	59,95 $\pm$ 9,4	9,69 $\pm$ 8,6
	+ 48	10 $\pm$ 6,6	12,1 $\pm$ 12,2 ^c	1,97 $\pm$ 2,4	45,9 $\pm$ 21,3	10,3 $\pm$ 12,4
Preparaciones seleccionadas pequeñas	0	77 $\pm$ 7,5	85,7 $\pm$ 9,0 ^a	5,6 $\pm$ 3,6 ^b	27,1 $\pm$ 14,3	59 $\pm$ 18,1
	+ 24	72,5 $\pm$ 18,7 ^{af}	71,3 $\pm$ 2,34 ^c	12,25 $\pm$ 6,2 ^c	31,0 $\pm$ 22,0	49,8 $\pm$ 23,1
	+ 48	48,5 $\pm$ 14,9	61,7 $\pm$ 2,7 ^c	10,97 $\pm$ 4,9	38,31 $\pm$ 25,0	44,68 $\pm$ 23,2
Preparaciones seleccionadas grandes	0	77 $\pm$ 8,6	80,22 $\pm$ 10,0 ^a	6,9 $\pm$ 3,9 ^a	29,0 $\pm$ 16,8	57,8 $\pm$ 18,7
	+24	69 $\pm$ 15,4 ^f	56,8 $\pm$ 20,7 ^a	13,1 $\pm$ 7,5	33,6 $\pm$ 19,8	46,8 $\pm$ 24,2
	+48	54,5 $\pm$ 9,8	42,3 $\pm$ 18,3 ^c	10,5 $\pm$ 5,6	39,6 $\pm$ 31,0	44,2 $\pm$ 27,6

a = diferencia entre las preparaciones no seleccionadas y las preparaciones seleccionadas por SLC, $P < 0,05$.
f = diferencia entre las preparaciones pequeñas y grandes seleccionadas por SLC, $P < 0,05$.

Viabilidad del espermatozoide: en la Figura 10 se ilustran los resultados de la coloración con SYBR-14/PI en preparaciones de espermatozoides pequeñas y grandes seleccionadas por SLC y no seleccionadas. La proporción de espermatozoides vivos fue significativamente mayor en las preparaciones de espermatozoides seleccionadas por SLC que en las preparaciones de espermatozoides no seleccionadas, mientras que las proporciones de espermatozoides muertos o vivos fueron significativamente menores en las preparaciones de espermatozoides seleccionadas que en las preparaciones de espermatozoides no seleccionadas. No hubo diferencias en estas proporciones entre las preparaciones de espermatozoides SLC-pequeña y SLC-grande. Con el tiempo, la proporción de espermatozoides vivos se redujo significativamente en las preparaciones de espermatozoides no seleccionadas, mientras que la proporción de espermatozoides muertos aumentó significativamente ($P < 0,05$). En contraste, estas proporciones no cambiaron en las preparaciones de espermatozoides seleccionadas por SLC. Para las preparaciones SLC-XL, no hubo diferencias entre los valores promedio de ningún parámetro para las preparaciones de espermatozoides SLC-pequeña y SLC-XL (Tabla 8).

Tabla 8: Viabilidad del espermatozoide en preparaciones de espermatozoides no seleccionadas, pequeñas y extra grandes por centrifugación en una sola capa usando tinción SYBR-14/PI (promedio $\pm$ desviación estándar) (n = 4).

	Pequeña			Extra grande		
	vivos	muerdos	moribundos	vivos	muerdos	moribundos
0 horas	82,8 $\pm$ 4,9	14,7 $\pm$ 5,3	2,5 $\pm$ 0,3	85,4 $\pm$ 2,5	12,2 $\pm$ 1,8	2,3 $\pm$ 0,8
24 horas	83 $\pm$ 6,2	14,2 $\pm$ 6,3	2,7 $\pm$ 0,3	86,1 $\pm$ 1,9	11,1 $\pm$ 1,7	2,9 $\pm$ 0,9

(continuación)

	Pequeña			Extra grande		
	vivos	mueritos	moribundos	vivos	mueritos	moribundos
48 horas	78,8 ± 7,9	17,7 ± 8,7	3,5 ± 1,1	80,3 ± 4,3	15,0 ± 4,1	4,6 ± 2,2
Nota: No hubo diferencias significativas entre las preparaciones de una sola capa SLC-pequeña y SLC-XL. Los valores de los parámetros no cambiaron significativamente con el tiempo para SLC-pequeña o SLC-XL						

Integridad de la membrana espermática: los resultados de la coloración con anexina-V/PI se presentan en la Tabla 9 (SLC-pequeña frente a SLC-grande) y la Tabla 10 (SLC-pequeña frente a SLC-XL). No hubo diferencias entre las preparaciones de esperma SLC-pequeña y SLC-grande en ningún punto de tiempo: las únicas diferencias entre las preparaciones de esperma no seleccionadas y seleccionadas coloreadas con anexina-/PI- (membranas intactas) se observó para la preparación de esperma SLC-pequeña en el tiempo correspondiente a 0 horas ($P < 0,05$). También hubo diferencias significativas entre las preparaciones de esperma no seleccionadas y seleccionadas por SLC en varios otros parámetros: entre las preparaciones no seleccionadas y seleccionadas por SLC a las 0 horas, 24 horas y 48 horas para la coloración con anexina-/PI+ ($P < 0,001$); entre las preparaciones no seleccionadas y seleccionadas por SLC a las 24 y 48 horas para la coloración con anexina+/PI+ ($P < 0,001$); entre las preparaciones no seleccionadas y SLC-pequeña a las 0 horas y 48 horas, y entre las preparaciones no seleccionadas y SLC-grande a las 24 horas para los espermatozoides coloreados con anexina+/PI- ($P < 0,001$). No hubo diferencias significativas entre las preparaciones SLC-pequeña y SLC-XL para ninguno de los parámetros medidos, y los valores no cambiaron significativamente con el tiempo.

Tabla 9: Integridad de la membrana espermática en preparaciones de esperma no seleccionadas y pequeñas y grandes obtenidas por centrifugación en una sola capa, usando una coloración con anexina-V/ioduro de propidio (promedio ± ds) (n = 8).

Tiempo	Tratamiento	Anexina-V-/PI-	Anexina-V-/PI+	Anexina- V+/PI+	Anexina-V +/PI-
0 horas	grande	74,2 ± 8,7	13,8 ± 6,1 ^c	8,4 ± 3,2	3,6 ± 2,0
	pequeña	75,2 ± 6,0 ^a	12,8 ± 2,8 ^c	8,8 ± 3,4 ^c	3,2 ± 0,6
	no seleccionadas	67,4 ± 8,1 ^a	24,7 ± 6,0 ^{cd}	5,7 ± 3,5 ^c	2,3 ± 0,6
24 horas	grande	69,1 ± 14,8	13,8 ± 3,4 ^c	11,6 ± 8,9 ^a	5,5 ± 4,1 ^b
	pequeña	75,0 ± 9,3	12,7 ± 3,3 ^c	7,1 ± 3,6	5,3 ± 4,1 ^{ce}
	no seleccionadas	65,1 ± 13,1	30,3 ± 12,5 ^c	2,5 ± 1,3 ^a	2,1 ± 1,1 ^{b c}
48 horas	grande	73,3 ± 6,4	15,1 ± 3,9 ^c	8,3 ± 2,7 ^a	3,4 ± 1,9 ^c
	pequeña	76,9 ± 4,2	15,2 ± 4,4 ^c	6,1 ± 1,6	2,1 ± 1,6 ^{ce}
	no seleccionadas	51,3 ± 16,3	43,6 ± 16,1 ^{cd}	3,7 ± 1,5 ^a	1,3 ± 0,9 ^c
Nota: no hubo diferencias entre las preparaciones de esperma seleccionadas por SLC grande y pequeña en ningún punto de tiempo. a, b, c = diferencia entre las preparaciones no seleccionadas y seleccionadas, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$; d = diferencia entre 0 y 24 horas, $P < 0,05$; e = diferencia entre 24 y 48 horas, $P < 0,05$					

Tabla 10: Integridad de la membrana espermática en preparaciones de esperma no seleccionadas y pequeñas y extra grandes obtenidas por centrifugación en una sola capa, usando coloración con anexina-V/ioduro de propidio (promedio ± ds) (n = 4).

	SLC-pequeña				SLC-extra grande			
	Anexina-V-/PI-	Anexina-V-/PI+	Anexina-V+/PI+	Anexina-V +/PI-	Anexina-V-/PI-	Anexina-V-/PI+	Anexina-V+/PI+	Anexina-V +/PI-
0 horas	76,8 ± 4,8	11,4 ± 1,6	8,9 ± 3,9	2,8 ± 0,3	76,9 ± 7,8	13,8 ± 3,8	5,7 ± 1,9	3,7 ± 2,2
24 horas	81,9 ± 3,8	9,5 ± 2,4	5,4 ± 3,1	3,2 ± 1,7	78,7 ± 3,9	13,1 ± 4,1	4,4 ± 1,8	3,8 ± 2,5
48 horas	80,0 ± 2,3	12,9 ± 4,3	5,5 ± 1,3	1,71 ± 1,5	80,8 ± 4,8	14,0 ± 6,8	3,4 ± 1,7	1,7 ± 0,7
Nota: No hubo diferencias significativas entre las preparaciones obtenidas por centrifugación en una sola capa SLC-pequeña y SLC-XL. Los valores de los parámetros no cambiaron con el tiempo en las preparaciones pequeña o XL.								

Integridad de la cromatina del esperma (SCSA): las preparaciones de esperma seleccionadas por SLC tuvieron una mejor integridad de la cromatina, como lo demuestra un valor de DFI menor que el de las preparaciones de

esperma no seleccionadas (Tabla 11) en todos los puntos de tiempo (0 horas, $P < 0,01$; 24 y 48 horas, $P < 0,001$). No hubo diferencias en el DFI promedio o la SD_DFI entre las muestras de esperma no seleccionadas y seleccionadas. Para las muestras XL, no hubo diferencias entre las preparaciones pequeña y grande para el DFI o la SD_DFI (DFI de la preparación pequeña: $11,2 \pm 3,8$, XL: $3 \pm 4,6$; SD_DFI de la preparación pequeña: $29,6 \pm 3,2$, XL: $27,4 \pm 6,0$). Sin embargo, hubo una diferencia significativa entre el DFI promedio de las preparaciones pequeña y XL ($416,3 \pm 42,8$ y $258,3 \pm 6,5$, respectivamente; $P < 0,05$).

Tabla 11: Parámetros del ensayo de la estructura de la cromatina del esperma para preparaciones de esperma no seleccionadas, pequeñas seleccionadas por SLC y grandes seleccionadas por SLC, almacenadas durante 48 horas a 5 °C (n = 8).

	No seleccionadas			Pequeñas seleccionadas por SLC			Grandes seleccionadas por SLC		
	DFI	DFI promedio	SD-DFI	DFI	DFI promedio	SD-DFI	DFI	DFI promedio	SD-DFI
0 h	$26,2 \pm 6,5^a$	$405,4 \pm 73,4$	$24,2 \pm 4,1$	$14,3 \pm 5,4^a$	$397,2 \pm 71,1$	$24,3 \pm 5,1$	$13,1 \pm 6,4^a$	$400,2 \pm 71,5$	$27,0 \pm 4$
24 h	$33,0 \pm 6,6^b$	$415,1 \pm 61,8$	$22,4 \pm 3,8$	$16,0 \pm 7,5^b$	$398,8 \pm 67,4$	$28,9 \pm 5,9$	$16,0 \pm 7,1^b$	$393,4 \pm 71,6$	$29,0 \pm 4,1$
48 h	$48,6 \pm 20,1^b$	$404,3 \pm 44,8$	$21,4 \pm 3,3$	$13,8 \pm 5,9^b$	$404,8 \pm 69$	$26,0 \pm 6,4$	$14,3 \pm 6,6^b$	$394,1 \pm 71,1$	$27,4 \pm 4,0$

Nota: a, b = DFI para las muestras no seleccionadas > seleccionadas por SLC, $P < 0,01$ y $P < 0,001$, respectivamente.

Rendimiento de esperma: hubo una diferencia considerable entre el rendimiento promedio para las preparaciones de esperma SLC-pequeña y SLC-grande ($32 \pm 22,3$ % frente a $8,9 \pm 8,9$ %, respectivamente, $P < 0,001$). En contraste, en un experimento diferente, los rendimientos de las muestras XL fueron aproximadamente 25 % mayores que para las muestras pequeñas ($25,5 \pm 14,1$ % en comparación con $20,2 \pm 5,9$ %).

Experimento 2: se usaron alícuotas de 23 eyaculados (de 4 caballos en el stud Västervo y 10 caballos en Flyinge AB) para realizar una SLC como se describió con anterioridad, lo que se denominó preparación pequeña (1,5 ml de eyaculado extendido en 4 ml de coloide en un tubo de 10 ml) y preparación grande (7,5 ml de eyaculado extendido en 15 ml o 20 ml de coloides con distintas densidades – 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % – en un tubo Falcon de 50 ml). Nota: no fue posible usar alícuotas de cada eyaculado para cada uno de los 10 tratamientos en el Experimento 2 debido a la escasez de muestra.

Después de la centrifugación a 300 x G durante 20 minutos, los sedimentos de esperma resultantes se recuperaron y se suspendieron una vez más en extensor de Kenney fresco en un tubo limpio, usando 1 ml de extensor de Kenney para el sedimento “pequeño” y 5 ml de extensor de Kenney para el sedimento “grande”. La calidad del esperma en las preparaciones de esperma resultantes se evaluó a través de la motilidad subjetiva del esperma y la integridad de la cromatina, como se describió en el Experimento 1, y también a través de la supervivencia y el rendimiento del esperma. Además, se realizó una evaluación de la motilidad objetiva usando el sistema Qualisperm™ (15) (eyaculados de Flyinge; 9) o el analizador de movimiento MTM (13) (eyaculados de Västervo).

Resultados: las mediciones promedio obtenidas con la evaluación de la motilidad subjetiva y con el sistema Qualisperm™ para las distintas combinaciones de volumen/densidad se ilustran en la Tabla 12, junto con la supervivencia, es decir, la duración de la motilidad. Aunque no hubo diferencias entre las distintas combinaciones de volumen/densidad de acuerdo con la evaluación de la motilidad subjetiva, hubo diferencias significativas entre las preparaciones de esperma pequeña y grande con los coloides de menores densidades, de acuerdo con la evaluación de la motilidad objetiva obtenida con Qualisperm™. Las preparaciones de esperma grandes no retuvieron la motilidad por tanto tiempo como las preparaciones pequeñas ($P < 0,001$).

Tabla 12: Efecto de la alteración del volumen y/o la densidad del coloide usado para aumentar la escala de las preparaciones de espermatozoides de caballo sobre la motilidad y la supervivencia promedio del esperma (n = 23).

Volumen/densidad	Tratamiento	Motilidad subjetiva (%)	Motilidad objetiva (%)*	Supervivencia (horas)
15/60	Preparación pequeña	85 ± 0	$76,5 \pm 20,6$	$112 \pm 27,7$
	Preparación grande	$83 \pm 7,6$	$72,1 \pm 16,4$	$160 \pm 13,9$
15/65	Preparación pequeña	$86,7 \pm 2,9$	$87,1 \pm 3,6^*$	$136 \pm 36,7$
	Preparación grande	$81,7 \pm 14,4$	$59,9 \pm 5,9^*$	$144 \pm 41,6$

(continuación)

Volumen/densidad	Tratamiento	Motilidad subjetiva (%)	Motilidad objetiva (%)*	Supervivencia (horas)
15/70	Preparación pequeña	91,7 ± 2,9*	86,9 ± 2,6	120 ± 24,0
	Preparación grande	80 ± 5,0*	82 ± 7,9	144 ± 24,0
15/75	Preparación pequeña	81,5 ± 5,8	86,4 ± 14,4	112 ± 27,7
	Preparación grande	80 ± 10	91,6 ± 3,8	112 ± 13,9
15/80	Preparación pequeña	85 ± 5	69,7 ± 16,1	112 ± 36,7
	Preparación grande	81,7 ± 14,4	73,3 ± 14,5	112 ± 27,7
20/60	Preparación pequeña	90 ± 0*	ND	96 ± 24
	Preparación grande	80 ± 5*	ND	80 ± 36,7
20/65	Preparación pequeña	90 ± 0	ND	112 ± 13,9
	Preparación grande	85 ± 5	ND	72 ± 41,6
20/70	Preparación pequeña	86,7 ± 5,8	ND	192 ± 98,0
	Preparación grande	80 ± 0	ND	104 ± 50,0
20/80	Preparación pequeña	76,7 ± 8,2	ND	84 ± 29,4
	Preparación grande	77,5 ± 6,89	ND	92 ± 18,1

Notas: *Qualisperm™. 1) Motilidad: No hubo diferencias significativas entre las preparaciones grandes. Diferencias significativas entre los tratamientos para las preparaciones de tamaño pequeño: 15/70 frente a 15/60, $P < 0,05$; 15/70 frente a 15/80, $P < 0,05$; 15/70 frente a 20/80, $P < 0,05$; 20/60 frente a 20/80, $P < 0,05$; 20/65 frente a 20/80, $P < 0,05$. 2) Supervivencia: No hubo diferencias significativas entre las preparaciones de tamaño pequeño; la preparación grande 20/65 tuvo una supervivencia significativamente menor que la preparación grande 15/60; no hubo diferencias significativas entre otras preparaciones grandes. Nota: pequeña, 0 horas frente a 24 horas, NS; grande, 0 horas frente a 24 horas, NS; pequeña frente a grande, 0 horas $P < 0,05$; 24 horas, NS.

Los resultados del DFI (Tabla 13) indicaron nuevamente que hubo diferencias entre las preparaciones control (SLC-pequeña) y las preparaciones SLC-grandes donde se usaron coloides de menor densidad, por ejemplo, 60 % y 65 % ($P < 0,05$ a las 0 horas), pero no donde se usó 70 % o más. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron a las 24 horas. No hubo diferencias significativas entre el DFI de las preparaciones SLC-pequeñas a las 0 horas y 24 horas, o para las preparaciones SLC-grandes a las 0 horas y 24 horas.

Tabla 13: Efecto de la alteración del volumen y/o la densidad del coloide usado para aumentar la escala de las preparaciones de espermatozoides de caballo sobre los valores promedio del DFI (%) (n = 23).

Volumen/densidad	Tratamiento	DFI (%) 0 horas	DFI (%) 24 horas
15/60	pequeña	8,6 ± 4,4	11,3 ± 6,7
	grande	13,7 ± 7,5	10,2 ± 4,3
15/65	pequeña	14,92 ± 1	5,2 ± 1
	grande	11,63 ± 1	22,4 ±
15/70	pequeña	12,2 ± 5,9	8,8 ± 2,6
	grande	15,2 ± 11,5	11,5 ± 6,4
15/80	pequeña	12,0 ± 6	18,6 ± 9,1
	grande	5,5 ± 1,9	5,0 ± 2,1
20/60	pequeña	7,5	7,0
	grande	12,6	14,3
20/65	pequeña	13,7 ± 2,9	18,2 ± 3,0
	grande	7,1 ± 2,1	8,7 ± 3,6
20/70	pequeña	5,5	5,0
	grande	8	6,9

(continuación)

Volumen/densidad	Tratamiento	DFI (%) 0 horas	DFI (%) 24 horas
20/80	pequeña	14,3 ± 5,4	16,0 ± 7,5
	grande	13,1 ± 6,4	16,0 ± 7,1

Experimento 3: las preparaciones de esperma “pequeñas” se procesaron como se describió para los experimentos 1 y 2, usando 1,5 ml de cada uno de los 7 eyaculados extendidos. Se realizaron SLC adicionales con un volumen aumentado de eyaculado (4,5 ml) sobre 4 ml de coloide en tubos de centrifuga de 10 ml, lo que se denominó “SLC-Inc”, vale decir, volumen aumentado). Después de la centrifugación, cada sedimento de esperma “SLC-Inc” se suspendió nuevamente en 3 ml de extensor de Kenney fresco, y todas las suspensiones de esperma se almacenaron a 5 °C. Se determinó la concentración de esperma para todas las preparaciones de SLC y se calculó el rendimiento de esperma. La motilidad de las preparaciones de esperma y el eyaculado extendido se evaluó diariamente usando CASA (13), mientras que la integridad de la membrana se midió 24 horas después de la preparación por SLC (14).

Resultados: los resultados de la motilidad determinada por CASA se ilustran en la Figura 11. No hubo diferencias en la motilidad entre las preparaciones de esperma SLC-pequeña y SLC-Inc, aunque hubo diferencias significativas entre las preparaciones no seleccionadas y ambos tipos de preparaciones seleccionadas a las 24 y 48 horas. La suspensión de esperma no seleccionada no tuvo una motilidad mensurable después de 48 horas.

Los datos de velocidad tampoco fueron diferentes entre los dos tipos de preparaciones de esperma seleccionadas por SLC (Figura 12). Aunque el rendimiento promedio para las preparaciones SLC-Inc fue mayor que para las preparaciones SLC-pequeñas (41,2 ± 28,3 % y 33,3 ± 21,3 %, respectivamente), esta diferencia no fue de significación estadística. La viabilidad del esperma no fue diferente entre los dos procedimientos de SLC (pequeñas, vivos: 72 ± 0,3 %; Inc, vivos: 72 ± 0,3 %).

Experimento 4: igual que el experimento 3, pero con la adición de un segundo procedimiento de aumento de la escala, usando 15 ml de coloide (densidad: 67,5 %) más 15 ml de eyaculado extendido, en un tubo Falcon de 50 ml (lo que se denominó preparación grande). Se realizaron mediciones de la motilidad subjetivas y por CASA (13) diariamente, las evaluaciones de la viabilidad se realizaron a las 0 horas y las 24 horas, al tiempo que se congelaron alícuotas para realizar un análisis subsiguiente de SCSA a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

Resultados: los resultados de la motilidad subjetiva y la motilidad determinada por CASA fueron similares a los obtenidos en el Experimento 3, sin diferencias entre ninguno de los procedimientos de SCL (Figura 13). Hubo una buena correlación entre los resultados del CASA y la determinación de la motilidad subjetiva ($r =$ entre 0,7 y 0,9 para las muestras centrifugadas y sin centrifugar, respectivamente; $P < 0,001$). Los rendimientos no fueron significativamente diferentes entre los tres tratamientos de SLC (promedio ± desviación estándar: pequeña: 33,3 ± 20 %; Inc: 36,3 ± 15,8 %; grande: 40 ± 21,7 %). Además, no hubo diferencias en la viabilidad del esperma entre ninguno de los procedimientos de aumento de la escala de la SLC (Tabla 14).

Tabla 14: Proporción de espermatozoides viables en distintas preparaciones de esperma por SLC a las 0 horas y 24 horas, promedio ± desviación estándar (n = 9).

	Centrifugación con volumen pequeño	Centrifugación con volumen aumentado	Centrifugación con volumen grande
0 h	78 ± 11,3	84,9 ± 8,9	81,4 ± 11,5
+24	76,5 ± 11,3	81,4 ± 8,9	76,6 ± 9,0
No hubo diferencias significativas entre ninguno de estos tratamientos de centrifugación.			

Se hallaron diferencias significativas en el DFI promedio entre las muestras sin centrifugar y centrifugadas, aunque hubo una interacción con el tiempo, ya que las muestras sin centrifugar presentaron un deterioro de la calidad del esperma con el almacenamiento, mientras que la integridad de la cromatina de las muestras centrifugadas no se deterioró con el tiempo (Tabla 15).

Tabla 15: Efecto de distintos procedimientos de aumento de la escala sobre la integridad de la cromatina de espermatozoides de caballo, promedio ± desviación estándar (n = 9).

	Centrifugación con volumen pequeño	Centrifugación con volumen aumentado	Centrifugación con volumen grande
0 horas	20,7 ± 10,2	14,2 ± 7,7	13,9 ± 6,8
24	19,2 ± 11,3	12,9 ± 8,0	19,2 ± 10,4
48 horas	15,0 ± 8,0	13,0 ± 8,0	21,0 ± 14,0
72 horas	17,0 ± 10,0	18,0 ± 11,0	22,0 ± 8,0

Conclusión: es posible aumentar la escala de la SLC incrementando el volumen de eyaculado extendido usado en 4 ml de coloide. Sin embargo, para continuar incrementando el volumen, es necesario usar un tubo de centrifuga más grande y ajustar la densidad del coloide, como se ilustra en la Tabla 16. Estos ajustes producen preparaciones de esperma que son equivalentes a la original con relación a la calidad y el rendimiento del esperma, sobre la base de la motilidad y la viabilidad del esperma, y la integridad de la cromatina.

Tabla 16: Comparación de parámetros que proporcionan una calidad comparable en preparaciones a mayor escala de esperma y la preparación original.

	Volumen de Coloide (ml)	Densidad del coloide (%)	Volumen de eyaculado extendido (ml)
Original	4	80	1,5
Volumen aumentado	4	80	4,5
Aumento de la escala grande	15	67,5	15-18

Ejemplo 5: toro

Objetos: (i) investigar la capacidad de fertilización en una IVF de espermatozoides bovinos preparados con un gradiente de densidad o en una sola capa de coloide; (ii) investigar el uso de centrifugación coloidal para seleccionar espermatozoides de tamaño normal a partir de una población polimórfica en un eyaculado de toro.

Procedimientos: para el primer experimento, se obtuvieron pajuelas de espermatozoides de toro criopreservadas en la Universidad de Gante, donde se realizó la prueba de IVF. Antes de la centrifugación, las pajuelas de semen extendido se descongelaron en agua a 37 °C por 12 segundos, y la concentración se ajustó en 100×10^6 millones por ml. La centrifugación coloidal se realizó como se describió para el semen de caballo, usando coloide E al 80 % para la centrifugación en una sola capa y 2 ml de coloide E al 40 % más 2 ml de coloide E al 80 % para el gradiente de densidad. Un operador experto realizó un análisis computarizado de la motilidad del esperma (CASA) en los controles sin centrifugar y en ambos tipos de preparaciones de esperma usando un analizador de la motilidad Hamilton Thorne. Se recolectaron datos para los siguientes parámetros: velocidad en un trayecto sencillo, velocidad en línea recta, velocidad en una curva, amplitud de la desviación lateral de la cabeza, frecuencia de batido, rectitud, linealidad, concentración, % de motilidad, % de motilidad progresiva, % de motilidad rápida, % de motilidad media, % de motilidad lenta y % de espermatozoides estáticos. Se usaron procedimientos convencionales (16) para determinar la tasa de fertilización (10) en los procedimientos de IVM e IVF. El cultivo de los oocitos fertilizados se prolongó por 8 días, después de lo cual se evaluó el % de desarrollo hasta blastocistos y la cantidad total de células. Para el segundo experimento, se recolectaron eyaculados de un toro del que se sabía que producía espermatozoides diploides y haploides. Los espermatozoides eran muy polimórficos y había espermatozoides macrocefálicos y microcefálicos presentes, junto con un intervalo completo de espermatozoides que eran de un tamaño aproximadamente normal. El semen se criopreservó en la Universidad de Helsinki, Finlandia, de la manera usual. Las pajuelas se enviaron a SLU para realizar más exámenes. Antes de la centrifugación, las pajuelas de semen extendido se descongelaron en agua a 37 °C por 12 segundos, y el semen se extendió con tampón B. Se usaron capas individuales de coloide con distintas densidades, las cuales variaron entre 40 y 90 % del coloide madre, para identificar las densidades apropiadas para el uso subsiguiente en un gradiente de densidad. La centrifugación coloidal se realizó como se describió con anterioridad, y el sedimento de esperma resultante se suspendió nuevamente en tampón B. Se usaron portaobjetos precolorados (Testsimplerts; Online Diagnostics, Alemania) para colorear los espermatozoides y realizar el examen microscópico. Se registró la proporción de espermatozoides macrocefálicos cada 200 espermatozoides en las muestras de esperma sin centrifugar y centrifugadas.

Resultados (primer experimento): la tasa de fertilización promedio, la tasa de desarrollo de blastocistos y la cantidad total de células fueron $56,27 \% \pm 29,1$, $23,5 \% \pm 17,4$ y $83,2 \pm 29,9$, respectivamente, para los espermatozoides preparados con un gradiente de densidad, y $58,1 \% \pm 23,3$, $24,5 \% \pm 14,3$ y $94,6 \pm 23,4$, respectivamente, para los espermatozoides preparados en una sola capa de coloide. Los valores promedio de los diversos parámetros del análisis computarizado de la motilidad del esperma no fueron diferentes entre los dos procedimientos de preparación de esperma (Tabla 17).

Tabla 17: Parámetros del CASA de los espermatozoides bovinos preparados por centrifugación con gradiente de densidad y en una sola capa.

Parámetro	Una sola capa	Gradiente de densidad	Parámetro	Una sola capa	Gradiente de densidad
VAP	112,36 $\pm$ 9,93	111,1 $\pm$ 8,87	Conc.	37,68 $\pm$ 17,69	36,96 $\pm$ 20,3
VSL	95,4 $\pm$ 8,87	94,92 $\pm$ 10,58	% de mot.	75,4 $\pm$ 10,5	71,4 $\pm$ 17,09

(continuación)

Parámetro	Una sola capa	Gradiente de densidad	Parámetro	Una sola capa	Gradiente de densidad
VCL	171,48 ± 10,98	167,44 ± 16,18	% de mot. prog.	61,4 ± 13,3	54,8 ± 16,8
ALH	7,08 ± 0,57	6,98 ± 0,71	% de mot. rápida	69,4 ± 11,04	64,6 ± 17,87
BCF	23,12 ± 5,63	23,3 ± 5,54	% de mot. media	6,6 ± 1,95	6,6 ± 1,95
STR	82,2 ± 2,28	83 ± 4,04	% de mot. lenta	14 ± 6,12	15,2 ± 9,49
LIN	55,6 ± 4,05	56,2 ± 3,70	% de estáticos	10,4 ± 6,69	13,4 ± 8,53
Nota: no hay diferencias significativas.					

(ii) Los resultados de la centrifugación en una sola capa con los espermatozoides polimórficos se indican en la Tabla 18. Casi todos los espermatozoides fueron capaces de pasar a través de las capas únicas de coloide al 40 % y 50 %. La mayor proporción de espermatozoides macrocefálicos se halló después de que el sedimento hubiera pasado a través de una capa única al 60 % (49 % de macrocefálicos), y luego se redujo nuevamente hasta 27 % de macrocefálicos cuando la densidad del coloide disminuyó hasta 70 %. Usando un gradiente de densidad con capas de 70/55 %, fue posible identificar dos subpoblaciones: una enriquecida en espermatozoides de tamaño normal en la interfase entre las dos capas (8 % de espermatozoides macrocefálicos y 92 % de espermatozoides normales), mientras que el sedimento de espermatozoides estuvo enriquecido en espermatozoides macrocefálicos (34 %). Usando coloides con densidades de 55 % y 70 %, fue posible obtener dos subpoblaciones de espermatozoides: una que contenía casi exclusivamente espermatozoides de tamaño normal, y otra enriquecida en espermatozoides macrocefálicos (Tabla 19). Los espermatozoides microcefálicos fueron eliminados en el coloide, por lo que no aparecieron en ninguna de las subpoblaciones seleccionadas.

Tabla 18: Proporciones de espermatozoides de distintos tamaños antes y después de la centrifugación en una sola capa de espermatozoides de toro.

		Grandes	Pequeños	Resto
Antes		24	6	70
Después de una SL al 40 %	Sedimento	35,5	1	63,5
	Coloide (solo pequeñas cantidades)	23	4	73
Antes		26	6	68
Después de una SL al 60 %	Sedimento	49	2	49
	Coloide	14	3	82
Después de una SL al 70 %	Sedimento	27	3,5	69,5
	Coloide	15	3,5	80

Tabla 19: Proporciones de espermatozoides de distintos tamaños antes y después de la centrifugación con gradiente de densidad de espermatozoides de toro.

		Grandes	Pequeños	Resto
Antes		32	65	3
Después 70/55	Sedimento	34	64,5	1,5
	70 coloide	17	81,5	1,5
	Interfase	8	92	0
	Parte superior (< 55 %) (cantidades pequeñas)	10	83,5	6,5

Conclusiones:

- 1) Los espermatozoides preparados en una sola capa de coloide no tienen un comportamiento o propiedades diferentes respecto de los espermatozoides preparados con un gradiente de densidad.
- 2) Usando una combinación de centrifugación en una sola capa y centrifugación con gradiente de densidad, fue posible separar los espermatozoides en distintas subpoblaciones, por ejemplo, una que contenía casi todos los

espermatozoides de tamaño normal y otra enriquecida en espermatozoides macrocefálicos.

Ejemplo 6: jabalí

Objeto: (i) investigar el efecto del aumento de la osmolaridad de una formulación coloidal y el tamaño del tubo de centrifuga sobre la eficacia de la selección del esperma de jabalí durante una centrifugación con gradiente de densidad, con el objeto de desarrollar formulaciones coloidales específicas para espermatozoides de animales, (ii) comparar la centrifugación con gradiente de densidad con la centrifugación en una sola capa de coloide para preparar espermatozoides de jabalí, (iii) investigar el efecto del autoclavado del coloide, y (iv) investigar el efecto del lavado del sedimento de esperma después de la centrifugación coloidal.

Procedimientos: se recolectó la fracción de esperma libre de gel del eyaculado de 8 jabalíes usando el procedimiento de la mano enguantada, y luego se la extendió inmediatamente en una relación de 1:1 (v/v) en solución de descongelamiento Beltsville. La concentración del esperma se ajustó en $100 \times 10^6/\text{ml}$. Las centrifugaciones con gradiente de densidad y en una sola capa se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito con anterioridad, usando coloide A al 80 % para la centrifugación en una sola capa y 2 ml de coloide A al 40 % más 2 ml de coloide A al 80 % para el gradiente de densidad. En un experimento, las réplicas de sedimentos de esperma se lavaron (suspendiendo nuevamente el sedimento en 5 ml de extensor de semen y centrifugando a $500 \times G$ por 10 minutos) o no se lavaron. La motilidad del esperma en las muestras de esperma no seleccionadas y seleccionadas se evaluó subjetivamente como se indica a continuación: se examinaron alícuotas ($0,5 \mu\text{l}$) por microscopía óptica de contraste de fases ($\times 200$) en una platina de microscopio caliente (38°C) inmediatamente después de la preparación, y luego una vez por día, hasta que la motilidad hubo disminuido hasta aproximadamente 20 %. Para las evaluaciones los días subsiguientes, las preparaciones de esperma se almacenaron durante la noche a temperatura ambiente ($19\text{-}24^\circ\text{C}$, dependiendo del clima) y se incubaron a 38°C por 15-30 minutos antes de evaluar la motilidad. La tasa de recuperación (rendimiento) se calculó como la proporción de los espermatozoides cargados inicialmente en la parte superior del coloide que aparecieron en el sedimento de esperma después de la centrifugación.

Resultados: el aumento de la osmolaridad del coloide usado para la centrifugación con gradiente de densidad de los espermatozoides de jabalí desde 305 hasta 330 mOsm resultó en un aumento de la proporción de espermatozoides con motilidad en la preparación de esperma resultante (Figuras 14 y 15). La motilidad del esperma se mantuvo al menos 24 horas más en las preparaciones de esperma centrifugadas que en los controles (alícuotas sin centrifugar), es decir, 7 u 8 días para los centrifugados en un gradiente de densidad, en comparación con menos de 6 días para los espermatozoides sin centrifugar. Para la comparación de las centrifugaciones en una sola capa de coloide y con gradiente de densidad, la motilidad del esperma fue significativamente mejor ($P < 0,001$) en las preparaciones de esperma centrifugadas (promedio $\pm$ desviación estándar: $79,6 \pm 8,1\%$ y $74,2 \pm 12,0\%$ para las centrifugaciones en una sola capa y con gradiente de densidad, respectivamente) que en los controles sin centrifugar ($62,9 \pm 12,7\%$). La cantidad de espermatozoides obtenidos después de la centrifugación (Tabla 20) y el rendimiento promedio no fueron diferentes entre los dos procedimientos (rendimiento promedio de espermatozoides con motilidad, una sola capa: $67,5 \pm 25,6\%$; gradiente de densidad: $59,6\% \pm 22,3\%$). La supervivencia del esperma (Figura 16) se vio aumentada significativamente por la centrifugación coloidal (preparaciones sin centrifugar: $3,1 \pm 0,3$ días, SL: $5,5 \pm 0,79$ días, DG: $5,75 \pm 0,62$ días; $P < 0,001$, para las preparaciones sin centrifugar frente a las preparaciones centrifugadas; SL frente a DG, ns). Para las muestras de esperma almacenadas, fue necesario realizar una incubación previa a la evaluación de la motilidad (Figura 17). La presencia de bacterias en las muestras de esperma sin centrifugar puede haber contribuido a la muerte de los espermatozoides. La centrifugación coloidal pareció eliminar las bacterias (evaluación visual subjetiva). El autoclavado de la formulación coloidal no tuvo efecto alguno sobre la cantidad de esperma, la motilidad del esperma o la supervivencia del esperma (Tabla 21). Además, el lavado del sedimento de esperma obtenido después de la centrifugación coloidal frente al uso del sedimento de esperma sin lavar no tuvo efecto alguno sobre la cantidad de esperma, la motilidad del esperma o la supervivencia del esperma (Tabla 22). Fue posible almacenar los espermatozoides de jabalí durante 24 horas antes de la centrifugación, sin que esto tuviera un efecto perjudicial sobre la motilidad del esperma y la duración de la motilidad en las preparaciones centrifugadas (Figura 18).

Tabla 20: Cantidad de espermatozoides de jabalí obtenidos después de realizar una centrifugación con gradiente de densidad y una centrifugación en una sola capa, promedio $\pm$ desviación estándar (millones) (n = 20)

Jabalí	Una sola capa	Gradiente de densidad	Valor de <i>P</i>
87	$107,17 \pm 20,3$	$84,5 \pm 20,0$	NS
1500	$49,5 \pm 28,7$	$45,2 \pm 15,8$	NS
62	$88,7 \pm 31,8$	$90,7 \pm 25,4$	NS
367	$93,2 \pm 25,5$	$90,8 \pm 32,7$	NS
Nota: Diferencias significativas entre jabalíes ($P < 0,01$), pero no entre eyaculados.			

Tabla 21: Efecto del autoclavado del coloide sobre la motilidad del esperma, la supervivencia del esperma y la cantidad de esperma en el sedimento.

Parámetro	Autoclavado	No autoclavado
Motilidad del esperma el día 1 (%)	78,6 ± 8,7	81,4 ± 6,4
Supervivencia del esperma (días)	4,7 ± 1,2	4,5 ± 1,3
Cantidad de esperma (x 10 ⁶)	88,5 ± 30,1	77,5 ± 30,2
Nota: las diferencias entre los coloides autoclavados y no autoclavados no fueron significativas.		

Tabla 22: Efecto del lavado del sedimento de esperma después de la centrifugación coloidal sobre la motilidad del esperma, la supervivencia del esperma y la cantidad de esperma.

Parámetro	Lavado	No lavado
Motilidad del esperma el día 1 (%)	80,7 ± 10,3	75,4 ± 9,9
Supervivencia del esperma (días)	6,1 ± 1,2	5,4 ± 1,1
Cantidad de esperma (x 10 ⁶)	82,5 ± 32,5	73,8 ± 24,1
Nota: las diferencias entre los coloides lavados y no lavados no fueron significativas.		

Conclusión: el aumento de la osmolaridad de la formulación coloidal mejora la selección de los espermatozoides durante la centrifugación con gradiente de densidad. La centrifugación en una sola capa de coloide produce preparaciones de esperma que tienen una motilidad y un rendimiento similares a las obtenidas con gradientes de densidad, y estas preparaciones presentan una motilidad del esperma y una duración de supervivencia mejoradas en comparación con las muestras de esperma control (sin centrifugar).

Ejemplo 7: perro

Objeto: investigar si la centrifugación en una sola capa (SLC) es beneficiosa para seleccionar espermatozoides de perro de buena calidad para la inseminación.

Procedimientos: se recolectaron eyaculados de esperma de diversas calidades de cuatro perros por manipulación digital. Se aplicaron alícuotas (4,5 ml) sobre 4 ml de coloide E al 80 % en un tubo de centrifuga de 12 ml. Después de la centrifugación a 300 x G durante 20 minutos, el sedimento de esperma resultante se suspendió nuevamente en extensor de yema de huevo-Tris (1 ml) (17). Se extendió una alícuota del eyaculado no seleccionado en extensor de yema de huevo-Tris para obtener la misma concentración de esperma que en la preparación de esperma seleccionada. Se realizó una evaluación de la motilidad usando un análisis de esperma asistido por ordenador (CASA) y una evaluación morfológica en todas las muestras de esperma no seleccionadas y seleccionadas.

Resultados: la motilidad del esperma promedio aumentó desde 77,2 ± 19,6 % antes de la SLC hasta 87,6 ± 2,7 % después de la SLC, mientras que la motilidad progresiva aumentó desde 48,6 ± 18 % hasta 67,9 ± 11 % (Tabla 23). La morfología normal promedio fue 62,2 ± 42,8 en las muestras no seleccionadas y 82,5 ± 19,1 % en las muestras seleccionadas por SLC. Después de un almacenamiento a 4 °C por 7 días, la motilidad del esperma fue <5 % en las muestras de esperma no seleccionadas y 57 ± 11,3 % en las preparaciones de esperma seleccionadas por SLC. El rendimiento de esperma varió entre 12 y 47 %, dependiendo de la calidad del esperma en el eyaculado original.

Tabla 23: Resultados del análisis de motilidad asistido por ordenador (CASA) para las muestras de esperma de perro no seleccionadas y seleccionadas por SLC.

	Motilidad total (%)		Motilidad progresiva (%)		Rendimiento (%)
	no seleccionadas	seleccionadas	no seleccionadas	seleccionadas	
Perro					
1	48,3	84,1	34,3	81,8	12
2	82,3	90	69	68,5	47
3	87,9	89,5	32,5	54,5	47,5
4	90,4	86,9	58,7	67,5	30
Promedio (SD)	77,2 (19,6)	87,6 (2,7)	48,6 (18)	67,9 (11)	34,1 (16,9)

Conclusión: Estos resultados preliminares indican que la SLC podría ser un procedimiento útil para mejorar la calidad del esperma de perro en dosis de esperma para la AI.

Referencias

- 1) Colenbrander, B., Gadella, B.M. y Stout, T.A.E (2003) The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom Anim* 38, 305-311.
- 2) Malmgren, L. (1998) Effectiveness of two systems for transporting equine semen. *Theriogenology* 50, 833-839.
- 3) World Health Organisation. (1999) WHO laboratory manual for the analysis of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cuarta edición. Reino Unido, Cambridge University Press.
- 4) Samardzija M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., Tomaskovic, A., Petric, J., Surina J., Grizelj, J., Karadjole, T. (2006) A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci* 3-4, 237-247.
- 5) Macpherson, M., Blanchard, T.L., Love, C.C., Brinsko, S.P., Thompson, J.A. y Varner, D.D. (2002) Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology* 58, 317-320.
- 6) Morrell, J.M. (2006) Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Dom Anim.* 40, 1-5.
- 7) Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proc. Am. Assoc. Equine Practice* 1975;21,327-336.
- 8) Williams, W. y Utica, N. (1920) Technique of collecting semen for laboratory examination with review of several diseased bulls. *Cornell Vet* 10, 87-94.
- 9) Lagerlöf, N. (1934) Morphological studies on the change in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 19, 254-267.
- 10) Evenson, DP., Darzynkiewicz, Z y Melamed, M.R. (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131-1133
- 11) Januskauskas, A., Johannisson, A y Rodriguez-Martinez, H. (2001) Assessment of sperm quality through fluorimetry and sperm chromatin structure assay in relation to file fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI-bulls. *Theriogenology* 55, 947-961.
- 12) Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. (2003) Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation to sperm viability, chromatin structure and field fertility. *Theriogenology* 60:743-758.
- 13) Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M y S Einarsson (2003) Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 76: 205-216.)
- 14) Saravia F, Hernández M, Wallgren MK, Johannisson A y H Rodríguez-Martínez (2007) Cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of boar spermatozoa. *Int J Androl* 30: 485-499.
- 15) Tejerina F, Buranamanuay K, Saravia F, Wallgren M y H Rodríguez-Martínez. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology* 2008;69:1129-1138.
- 16) Tanghe, S., Van Soom, A., Sterckx, V, Maes, D y de Kruif, A. (2002) Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. *Reprod Domest Anim* 37, 127-132.
- 17) Ponglowhapan, S. Essen-Gustavsson, B. y Linde Forsberg C. (2004) Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62, 1498-1517.

REIVINDICACIONES

1. Composición para la separación de los espermatozoides de una muestra de semen, que consiste en:

- agua,
- cloruro sódico en una concentración de 97,5-140,0 mM
- 5 - cloruro potásico en una concentración de 4,0-5,5 mM
- glucosa en una concentración de 1,0-1,4 mM
- EDTA en una concentración de 0,10-0,14 mM
- HEPES en una concentración de 15,0-19,0 mM
- citrato tri-sódico en una concentración de 4,8-8,3 mM
- 10 - lactato en una concentración de 0-4,0 mM; y
- partículas de sílice recubiertas con silano en una concentración de 300-1000 g/l

teniendo dicha composición un pH de 7,0-7,35 y una osmolaridad de 320-330 mOsm.

2. Procedimiento de preparación de espermatozoides a partir de una muestra de semen de un animal no humano, que comprende la etapa de separar los espermatozoides de los otros constituyentes del semen por centrifugación a través de una sola capa de una formulación coloidal, en el que la formulación coloidal es una composición de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la densidad de la formulación coloidal está en el intervalo de 1,05-1,14 g/ml.

4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que la osmolaridad de la formulación coloidal es de 320-330 mOsm.

5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la separación se realiza en un recipiente con un volumen de 10 ml o más, tal como 50-200 ml.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la altura del coloide es de 30-45 mm.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la composición coloidal es una dilución tampón al 65-70 % de una formulación madre coloidal que tiene una densidad de 1,14 g/ml.

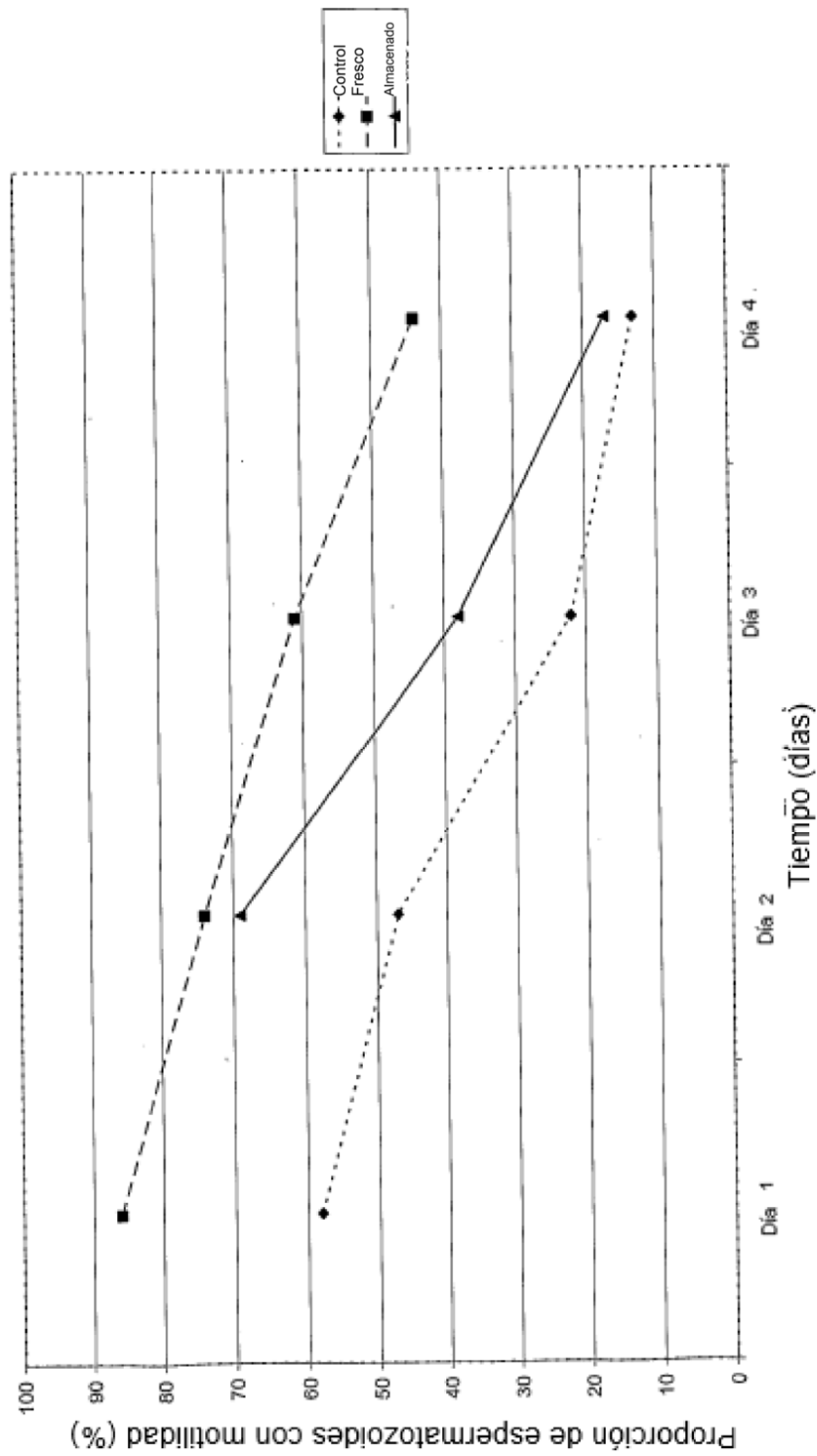
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que la muestra de semen no es oligospermica.

9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que los espermatozoides se separan del plasma seminal y sus componentes celulares o no celulares.

10. Procedimiento de separación de una subpoblación de esperma de interés de una muestra de semen de un animal no humano, que comprende las etapas
proporcionar un gradiente de densidad que tiene al menos dos capas de la composición de acuerdo con la reivindicación 1, teniendo cada capa una densidad diferente;
separar las subpoblaciones de esperma en la muestra de semen por centrifugación a través de gradiente de densidad; y
35 seleccionar la subpoblación de esperma de interés.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la subpoblación de esperma es de espermatozoides haploides de semen de toro.

Figura 1: Efecto del uso de espermatozoides fresco o almacenado para la centrifugación coloidal sobre la supervivencia del espermatozoides de caballo (n = 12).



Nota: día de recolección = Día 1; por lo tanto, Día 2 = 24 horas, Día 3 = 48 horas, etcétera.

Figura 2: Efecto del lavado (n = 38) o el uso del sedimento de esperma sin lavar (n = 38) después de la centrifugación en una sola capa sobre las estimaciones de motilidad subjetivas promedio (%).

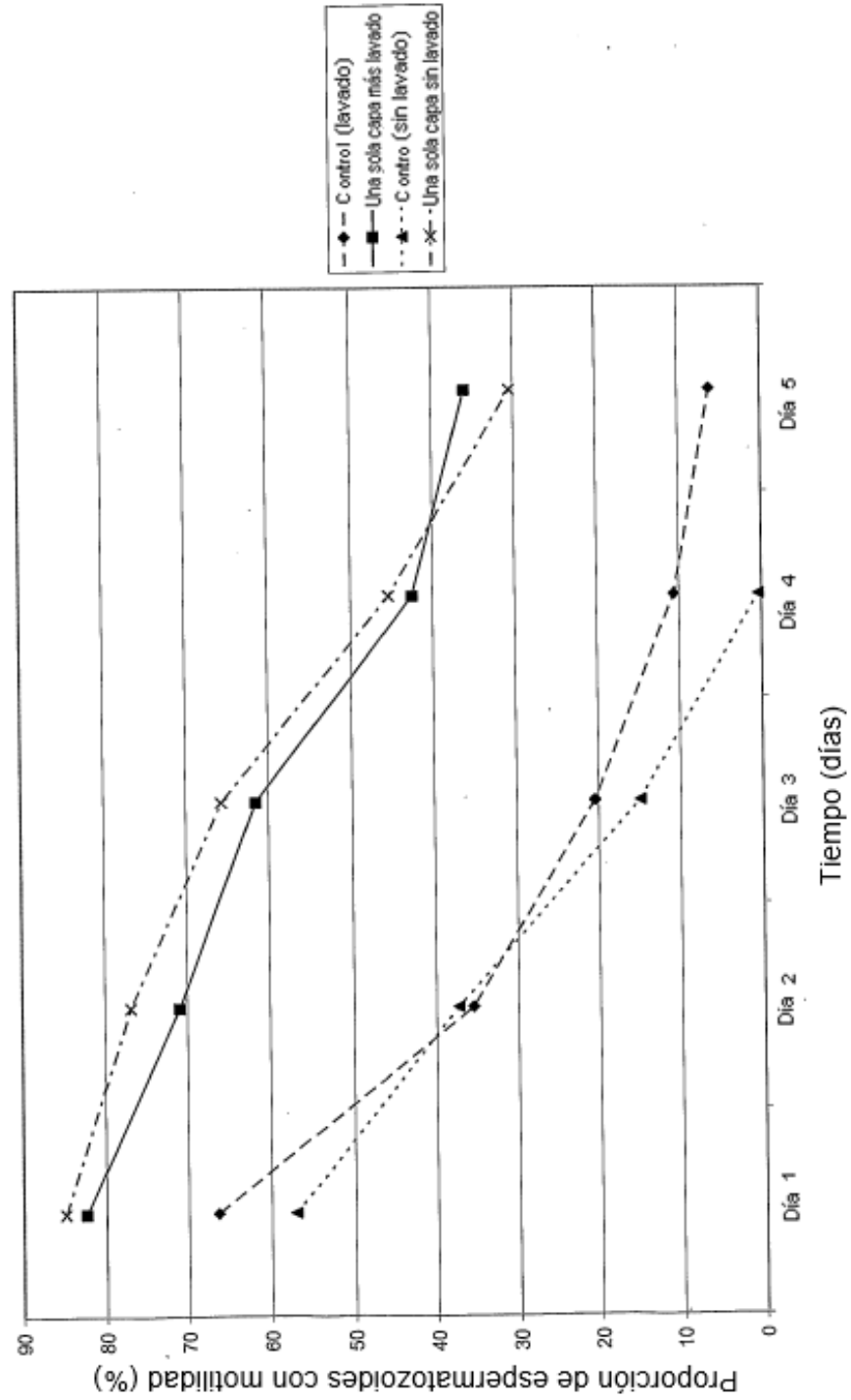


Figura 3: Efecto de la osmolaridad del coloide sobre la proporción de espermatozoides de caballo con morfología normal después de la centrifugación coloidal (n = 15).

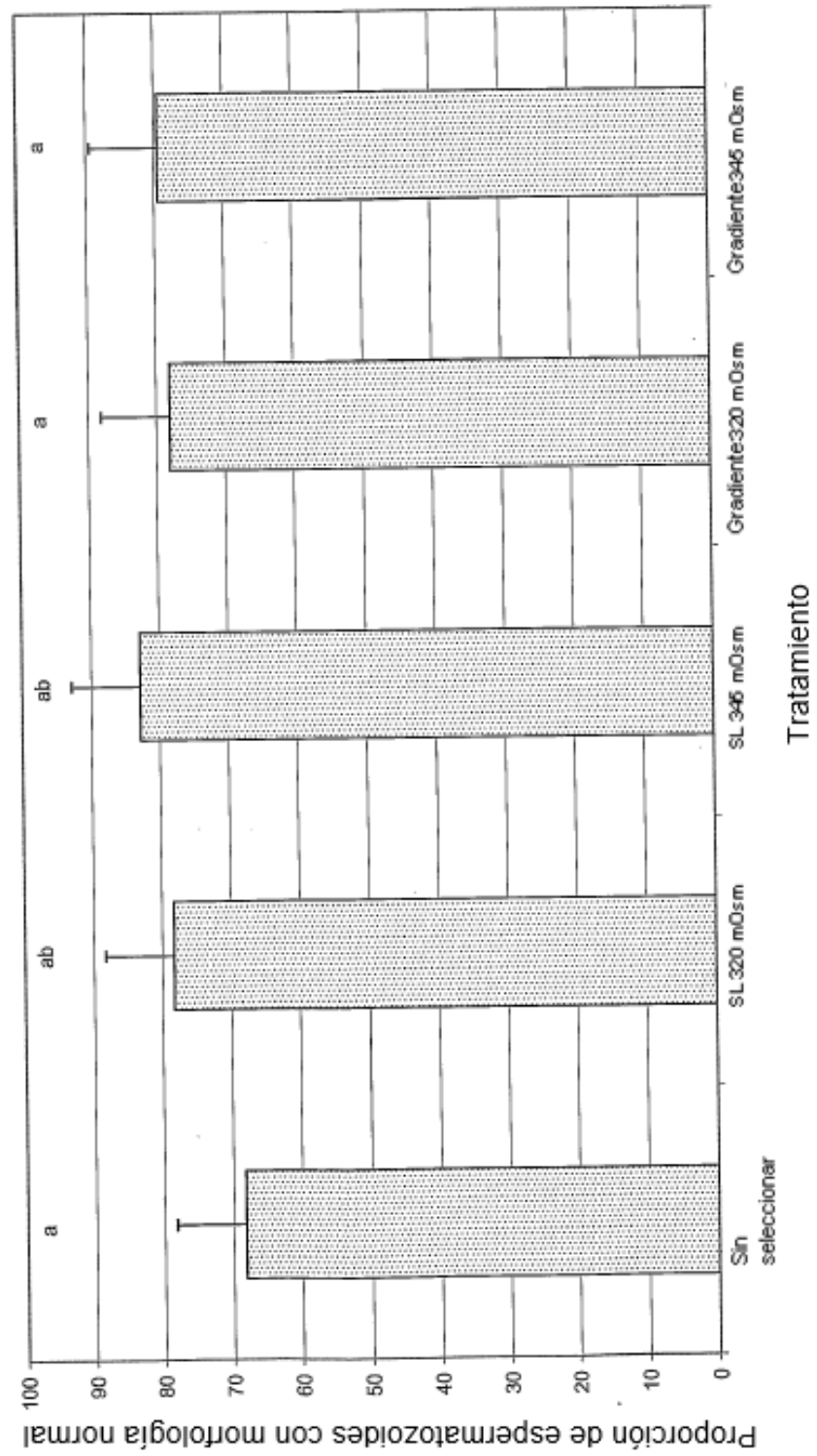


Figura 4: Efecto de la osmolaridad del coloide sobre los defectos de la cromatina del esperma (n = 12).

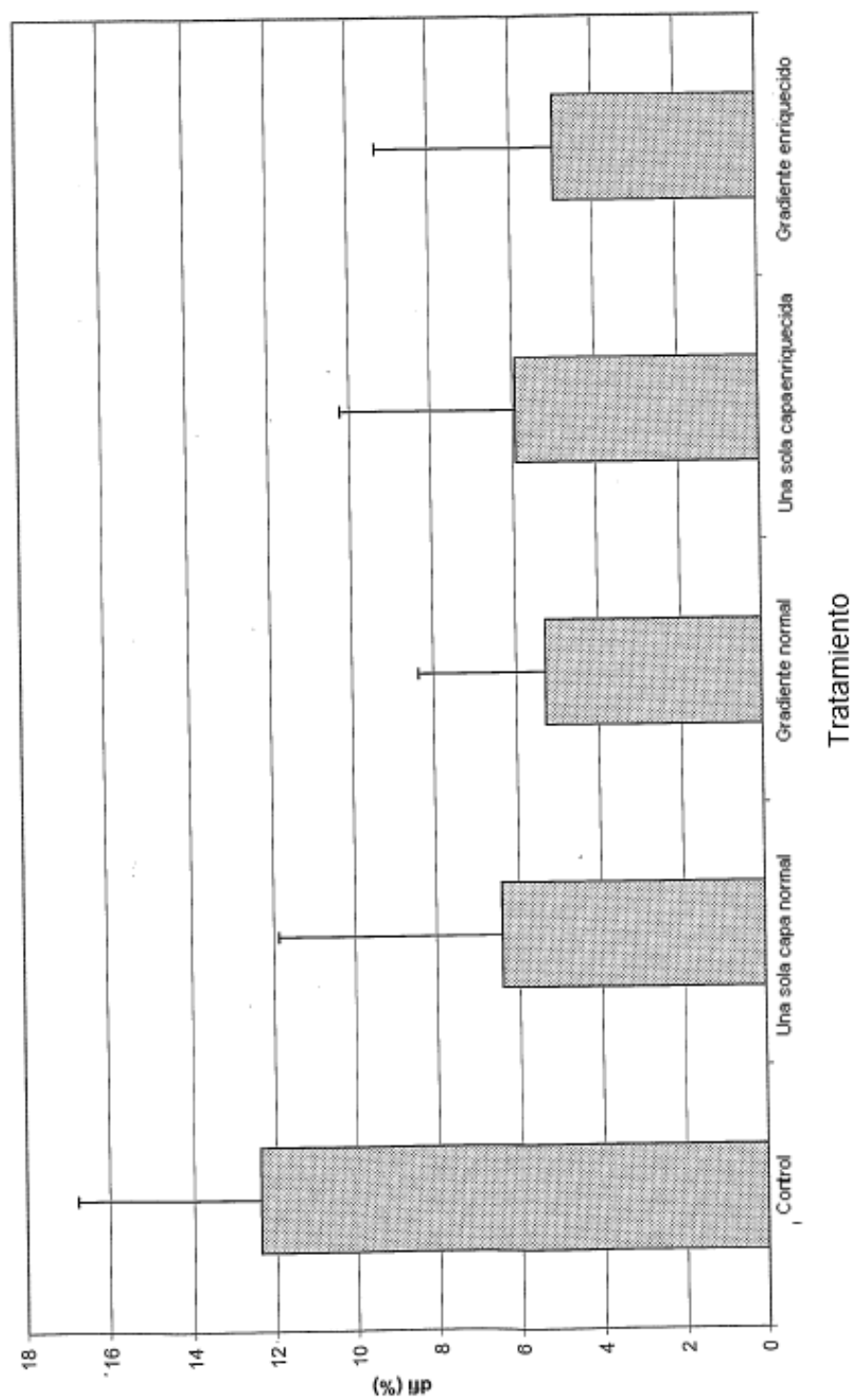


Figura 5: Efecto de la separación de los espermatozoides del plasma seminal sin la selección concomitante de los espermatozoides de buena calidad usando coloide con una densidad de 40 % (n = 3).

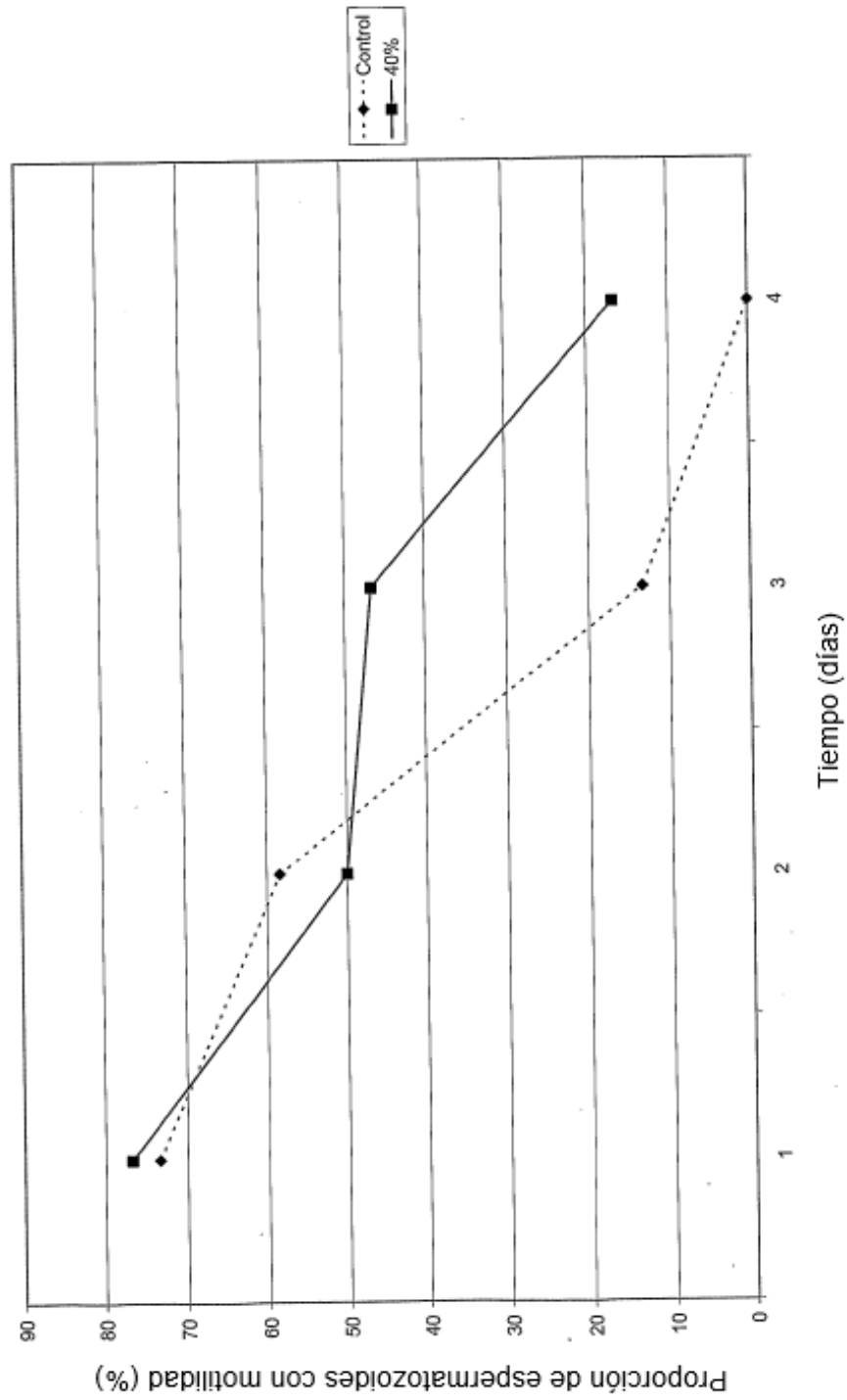


Figura 6: Comparación de los coloides de distinta densidad (80 % y 60 %) usados para la centrifugación en una sola capa (n = 8).

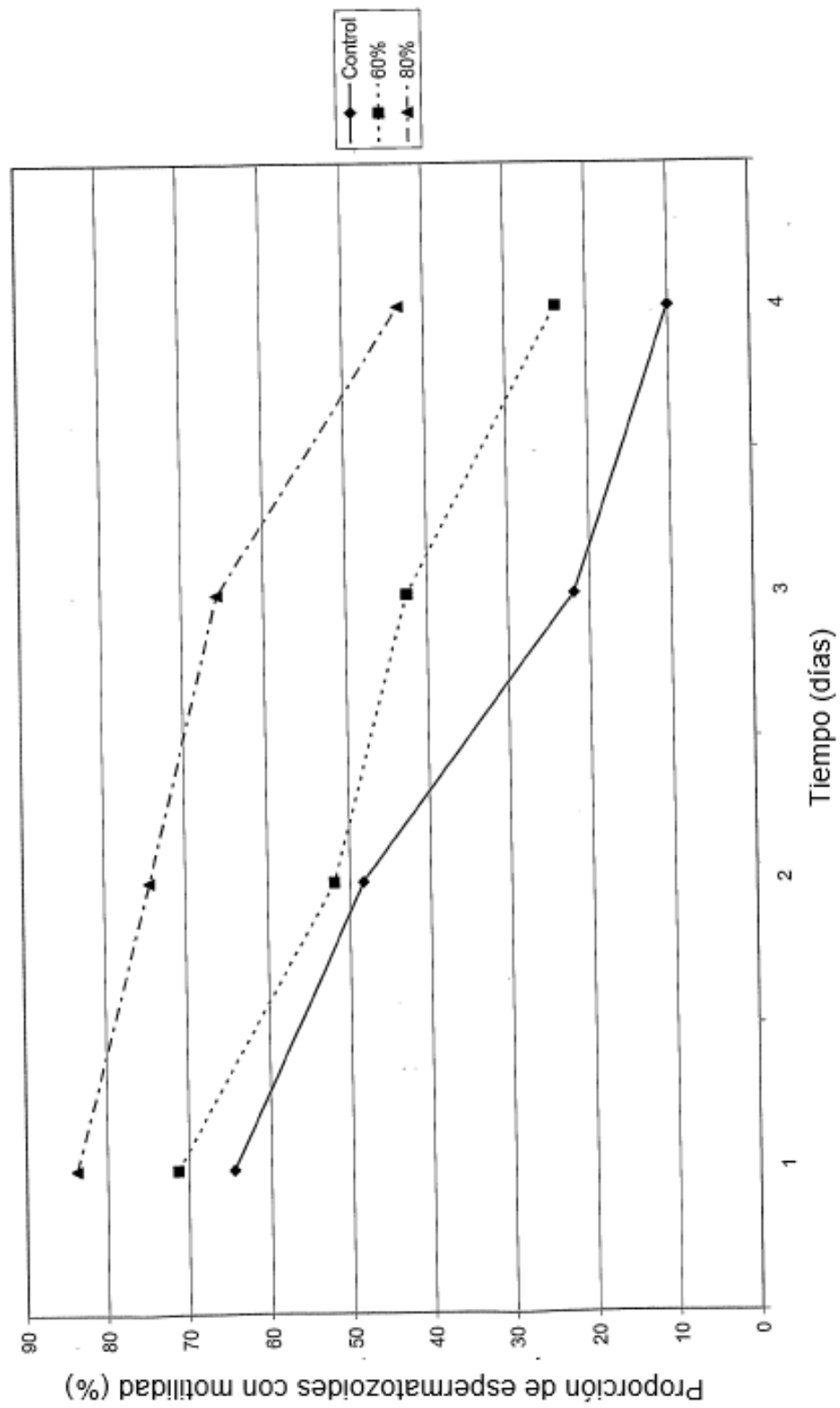


Figura 7: Efecto del aumento de la escala de la centrifugación en una sola capa sobre el rendimiento de espermatozoides de caballo: control (4 ml de coloide más 1,5 ml de eyaculado extendido), con un índice de 1 para cada tratamiento.

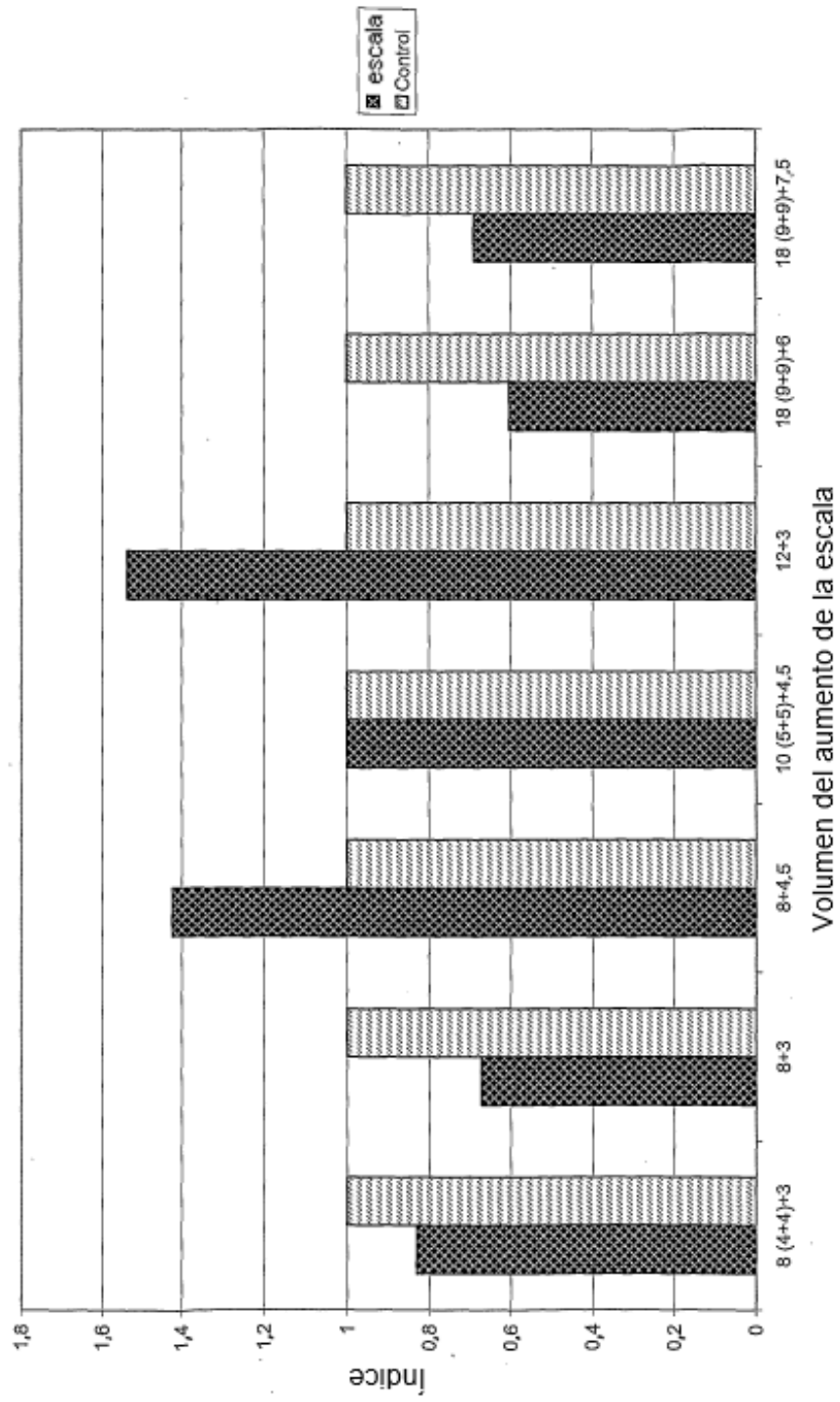


Figura 8: Motilidad subjetiva en muestras de esperma antes y después de la centrifugación en una sola capa, donde se comparan tratamientos pequeños (4,0 ml de coloide más 1,5 ml de eyaculado extendido) y grandes (20 ml de coloide y 7,5 ml de eyaculado extendido) (n = 8).

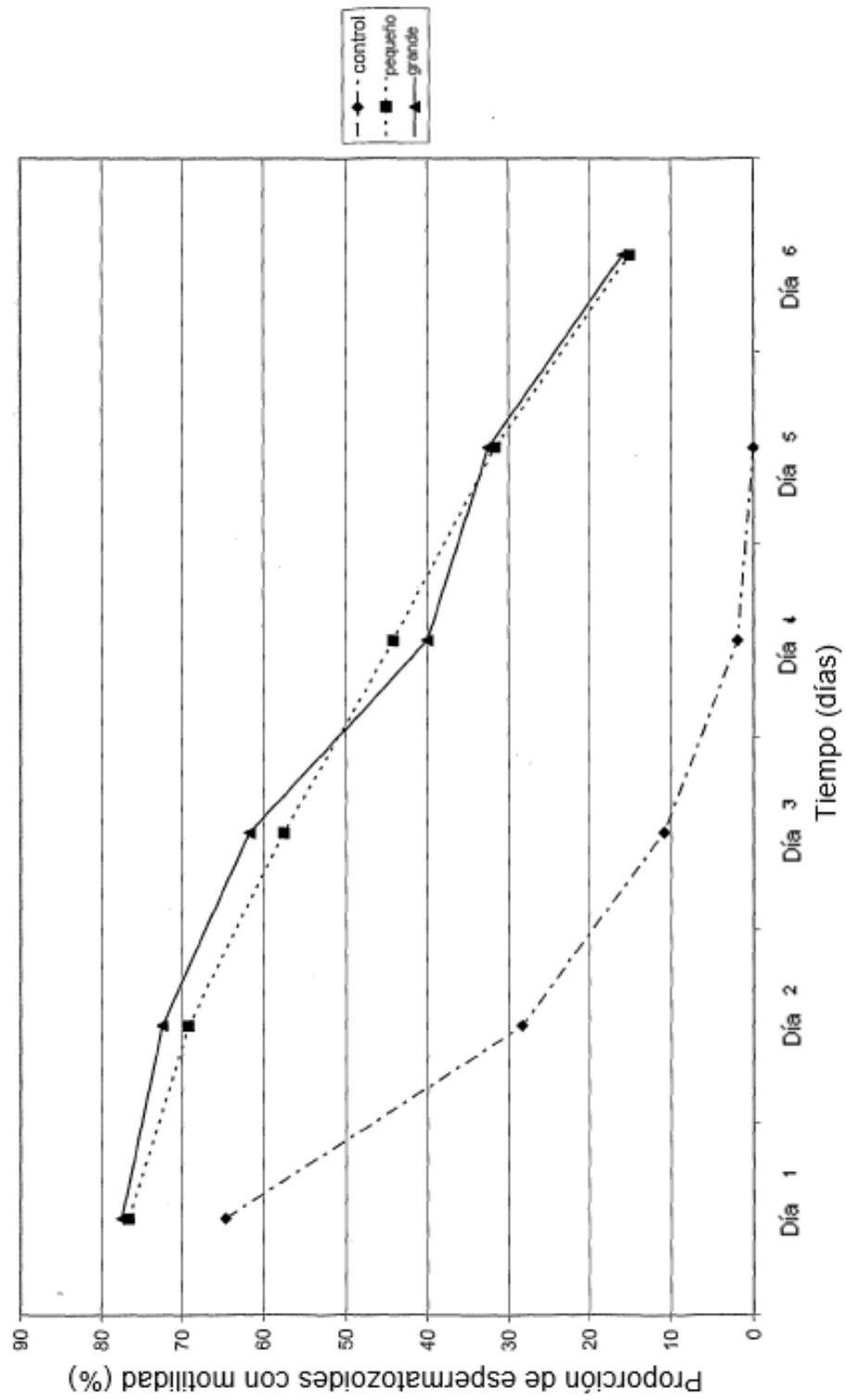


Figura 9: Motilidad subjetiva en muestras de esperma antes y después de la centrifugación en una sola capa, donde se comparan tratamientos pequeños (4,0 ml de coloide más 1,5 ml de eyaculado extendido) y extra-grandes (60 ml de coloide y 22,5 ml de eyaculado extendido) (n = 4).

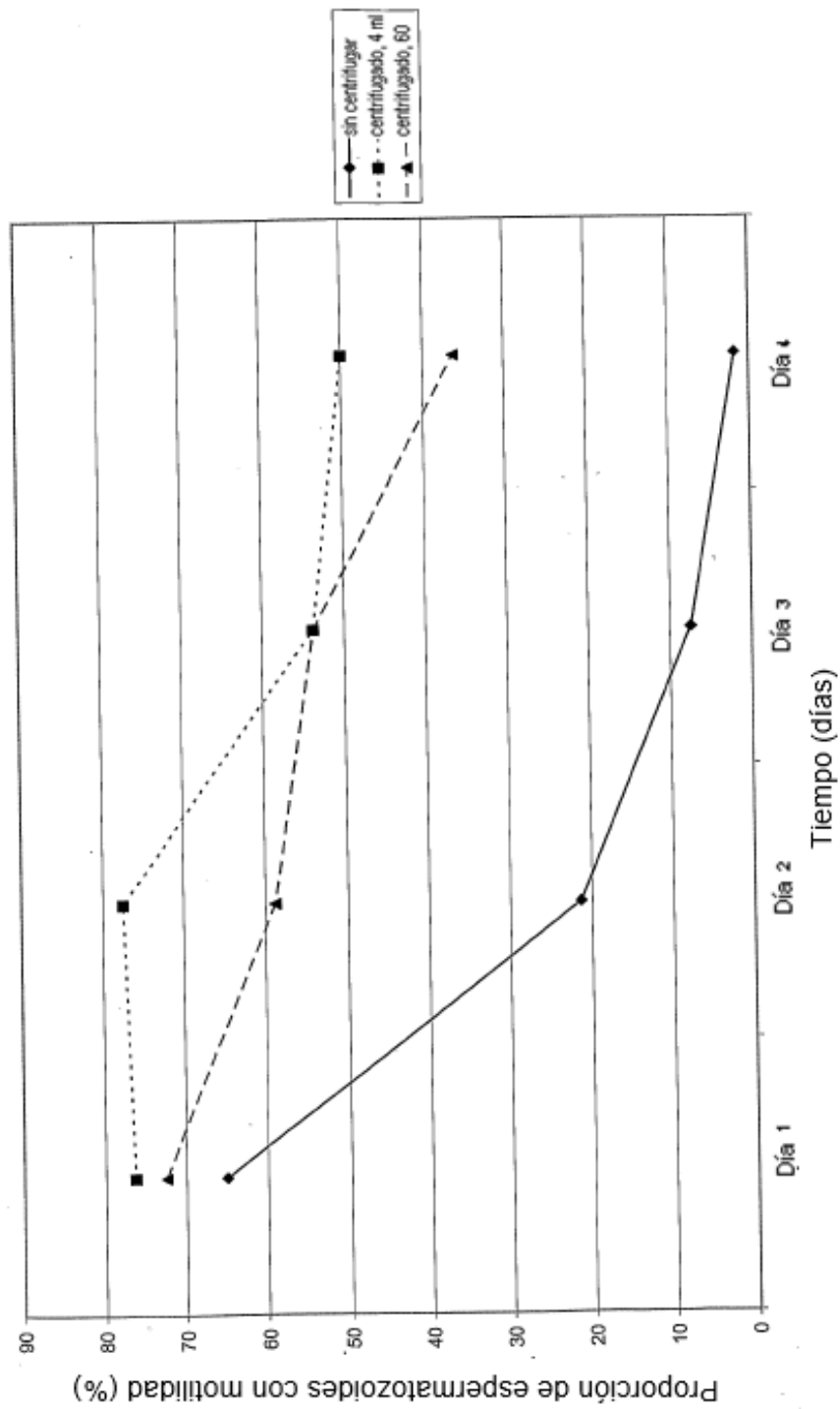


Figura 10: Efecto del aumento de la escala de la centrifugación coloidal sobre la viabilidad del espermatozoides de caballo (n = 8).

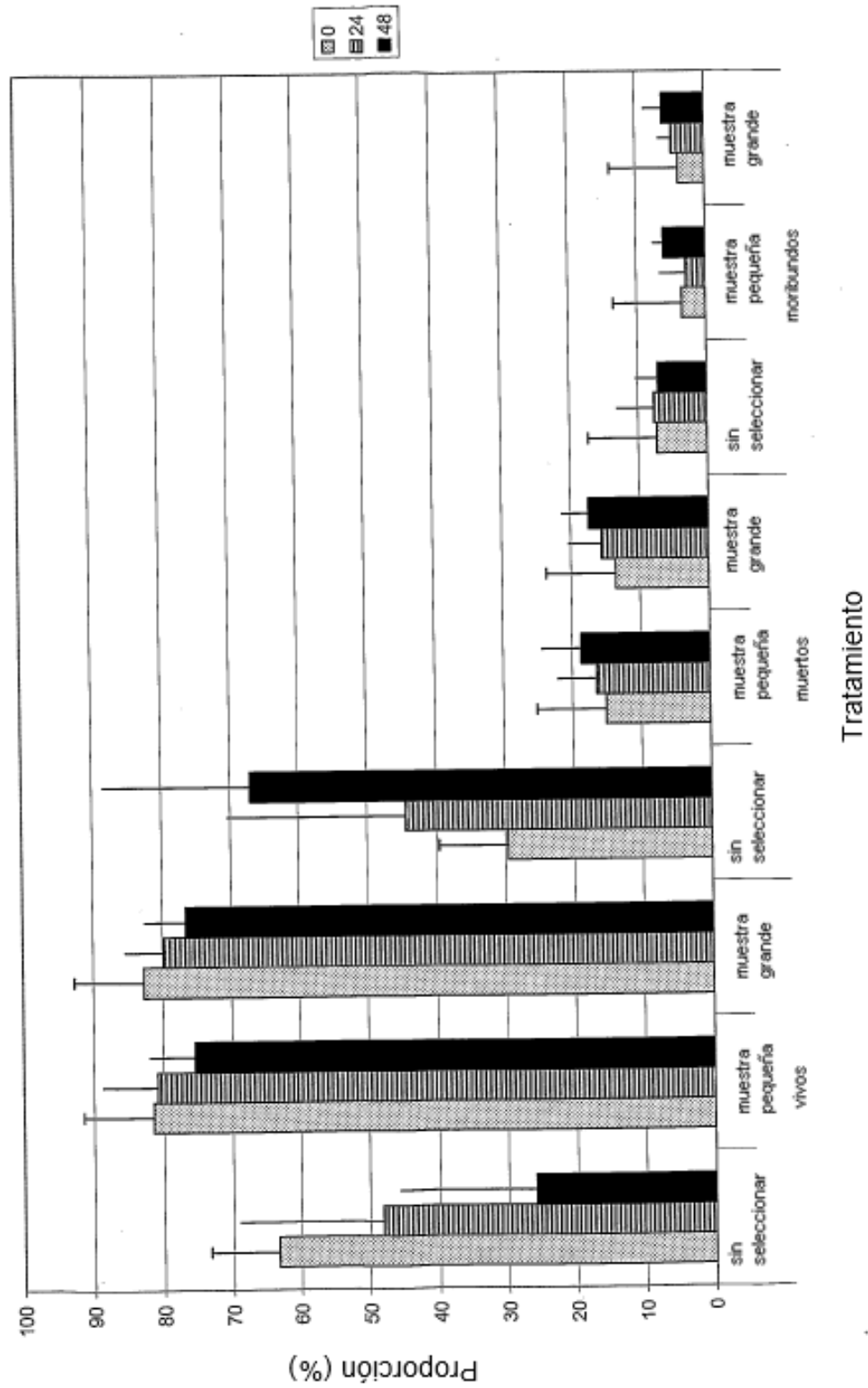


Figura 11: Efecto del aumento de la escala de la centrifugación coloidal sobre la motilidad del espermato de caballo (n = 7).

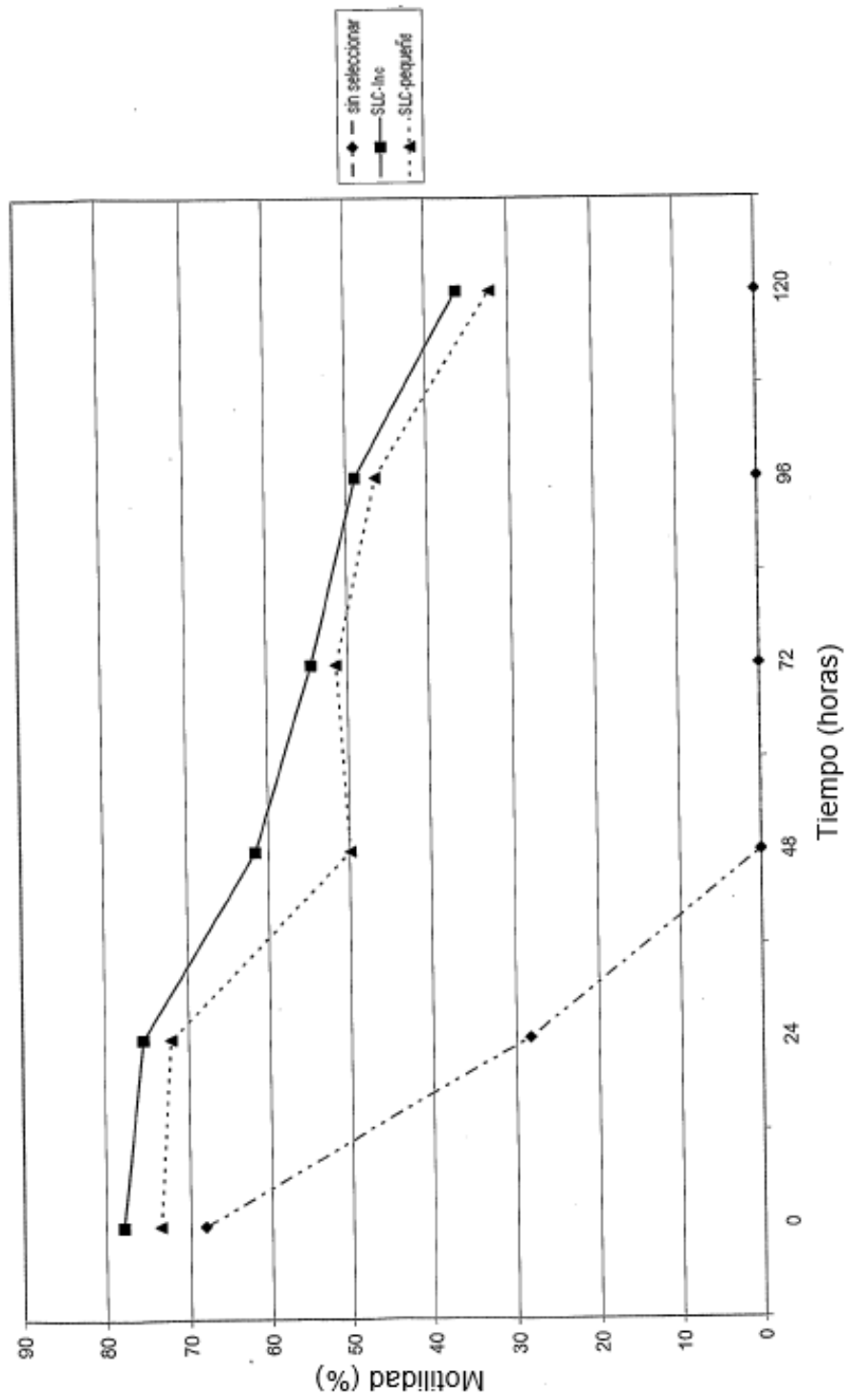


Figura 12: Efecto del aumento de la escala de la centrifugación coloidal sobre la velocidad del espermato de caballo (n = 7).

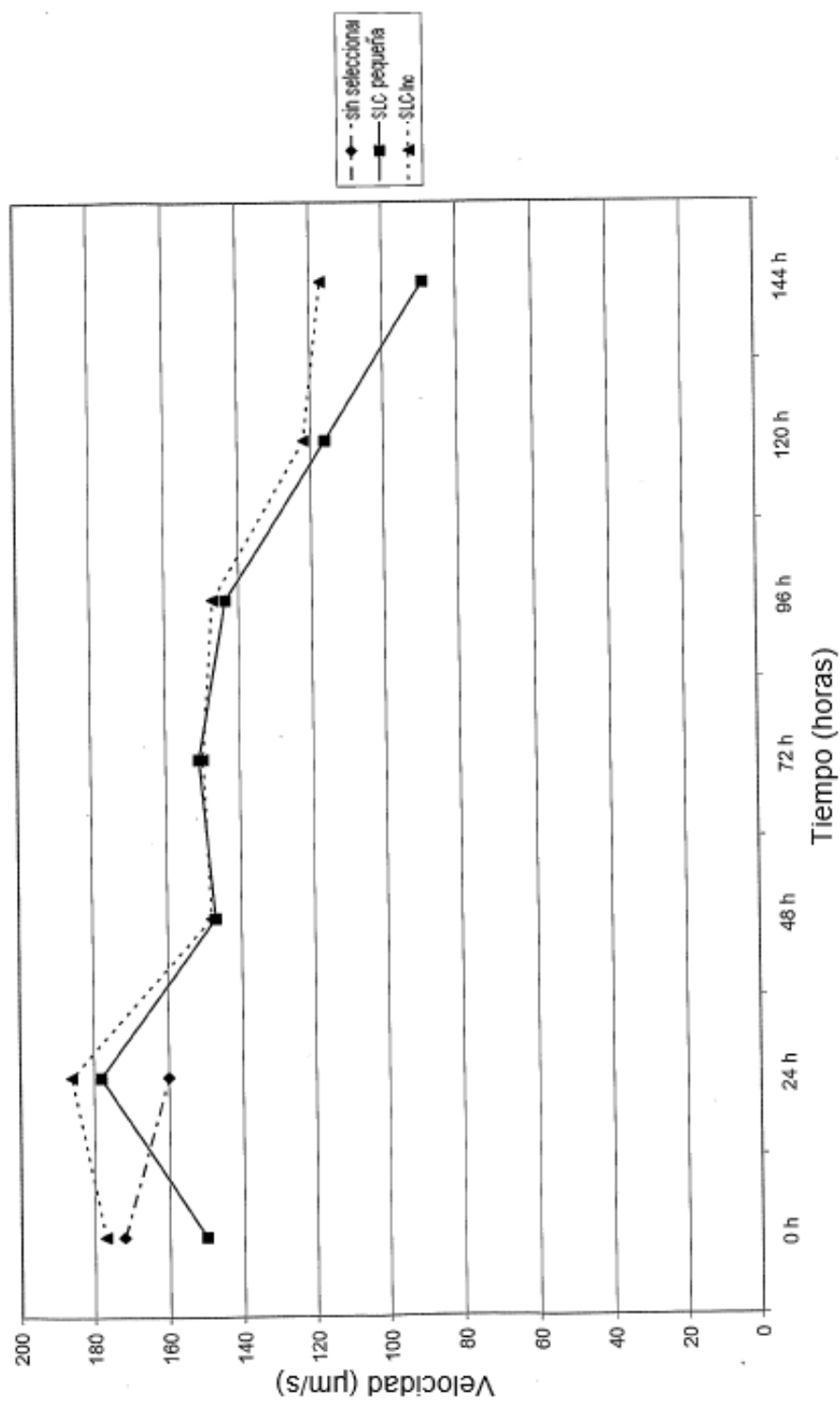


Figura 13: Efecto del aumento del volumen del coloide y el volumen del eyaculado sobre la motilidad del esperma de caballo (n = 9).

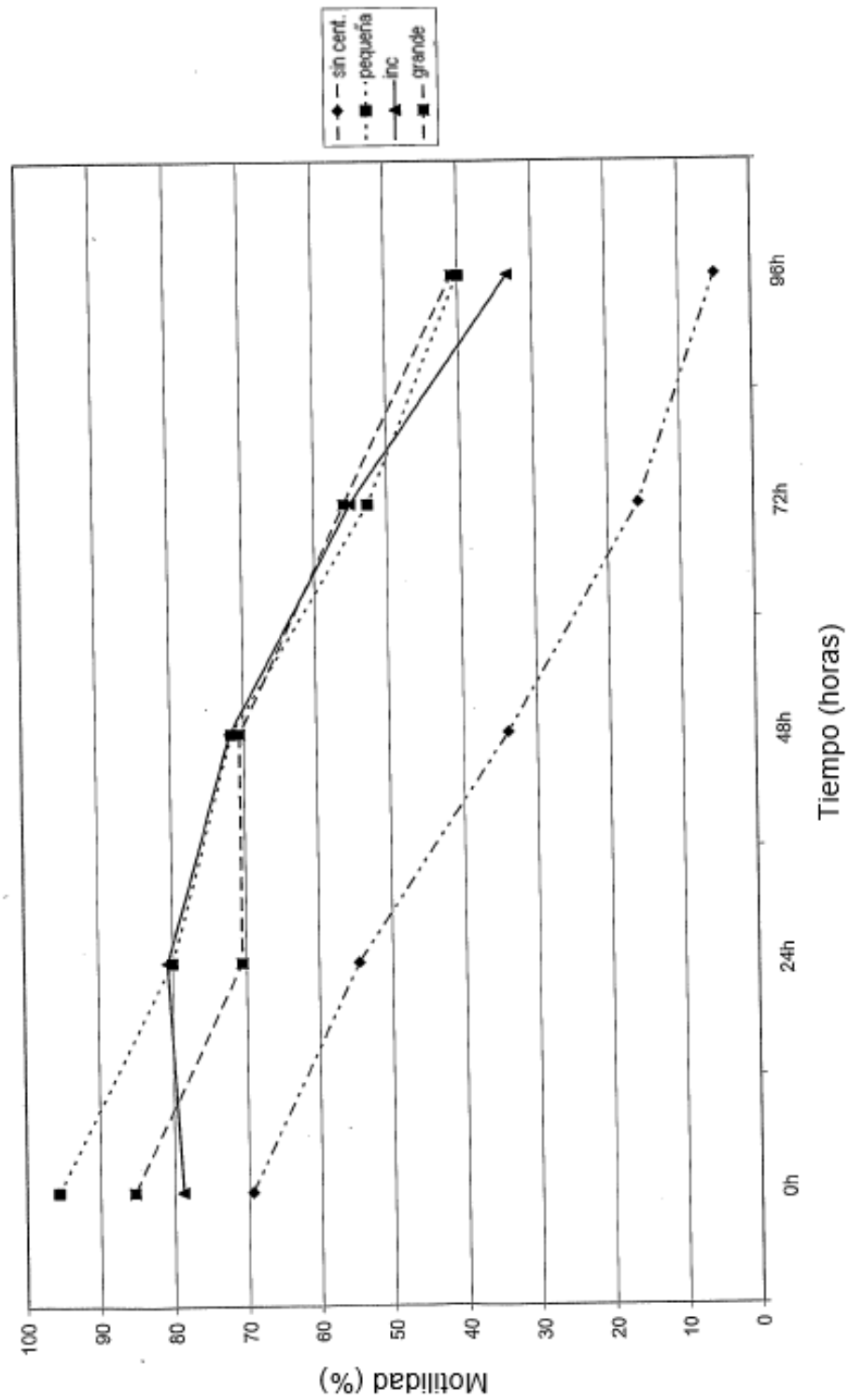
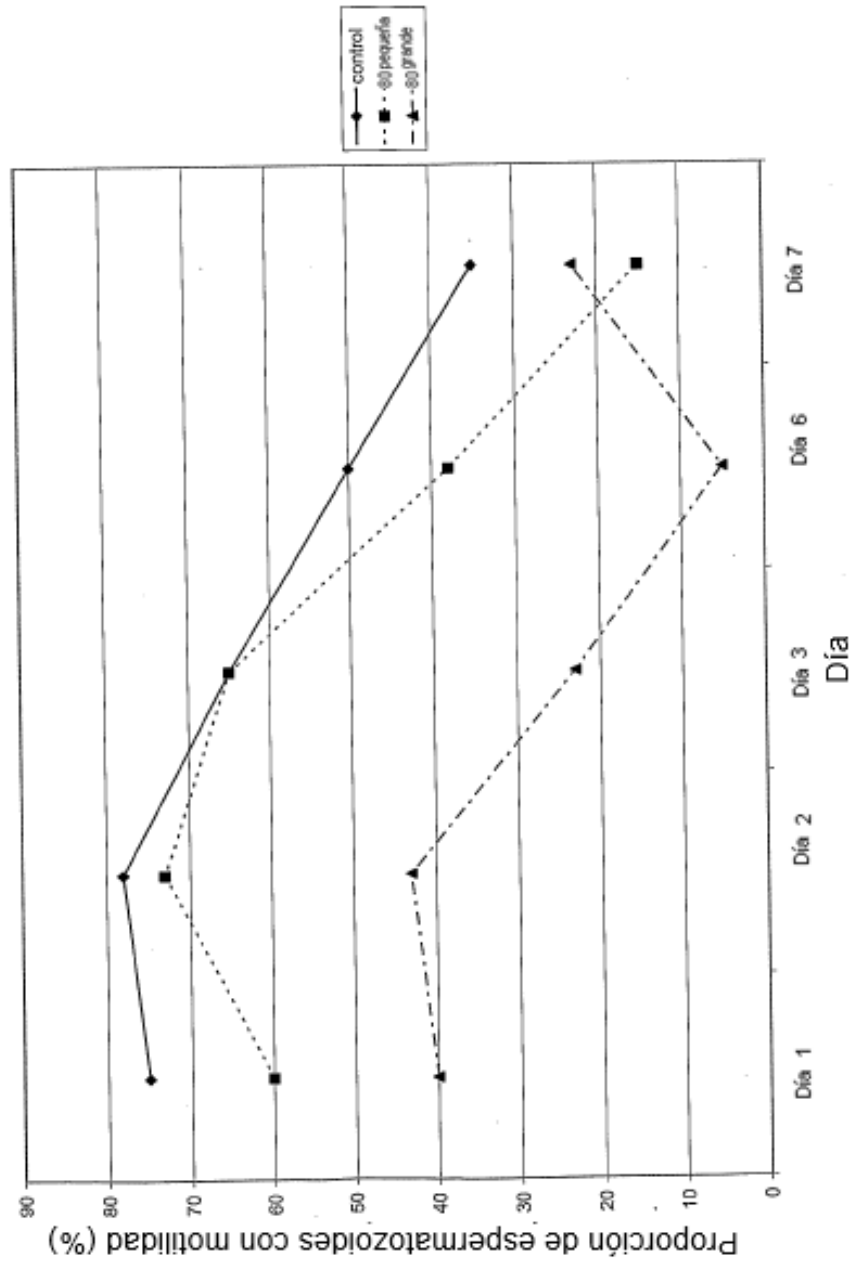
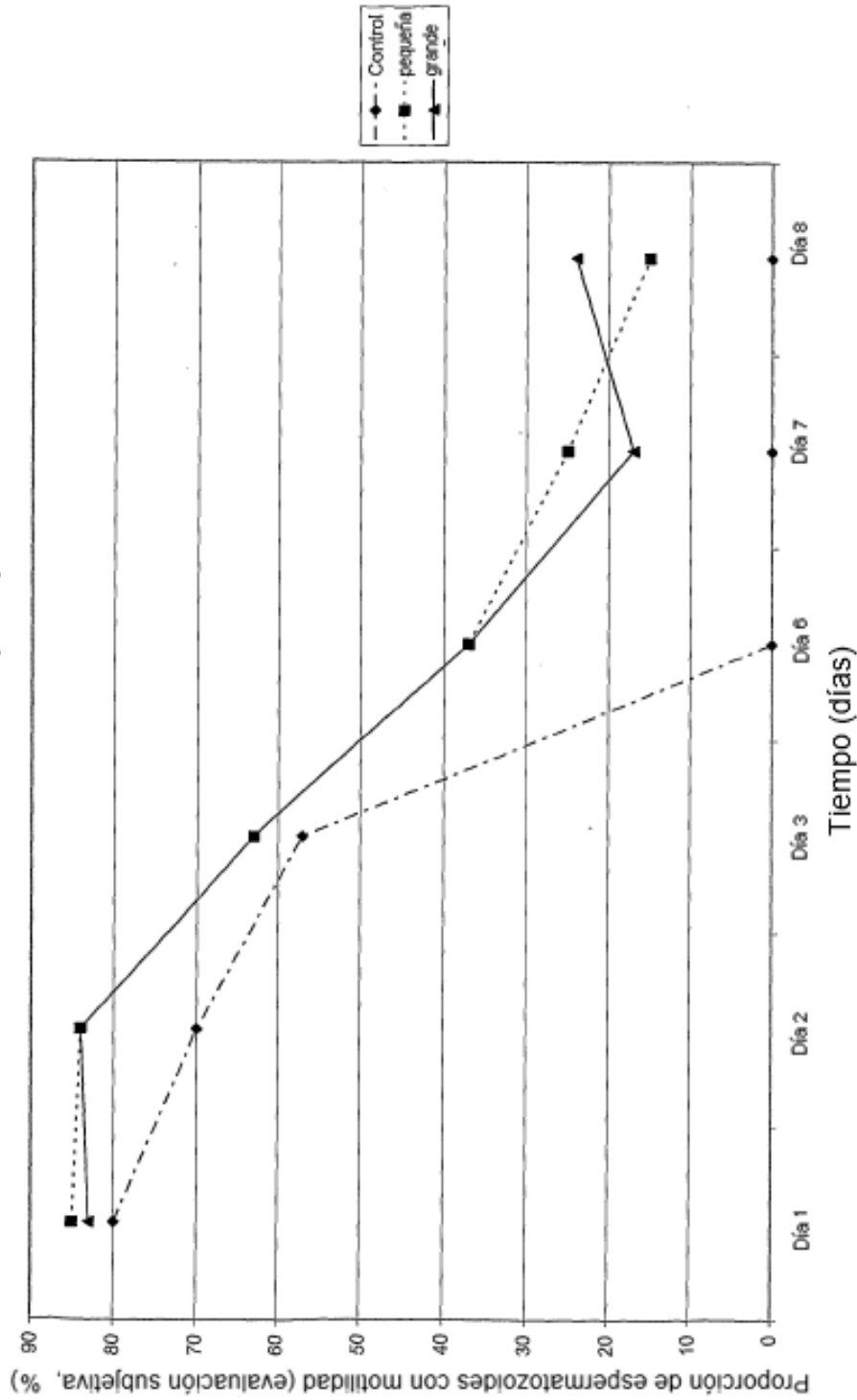


Figura 14: Efecto de la osmolaridad del coloide sobre la motilidad del espermatozoide de jabalí después de la centrifugación con gradiente de densidad en tubos de centrifuga pequeños y grandes: osmolaridad = 305 mOsm (n = 4).



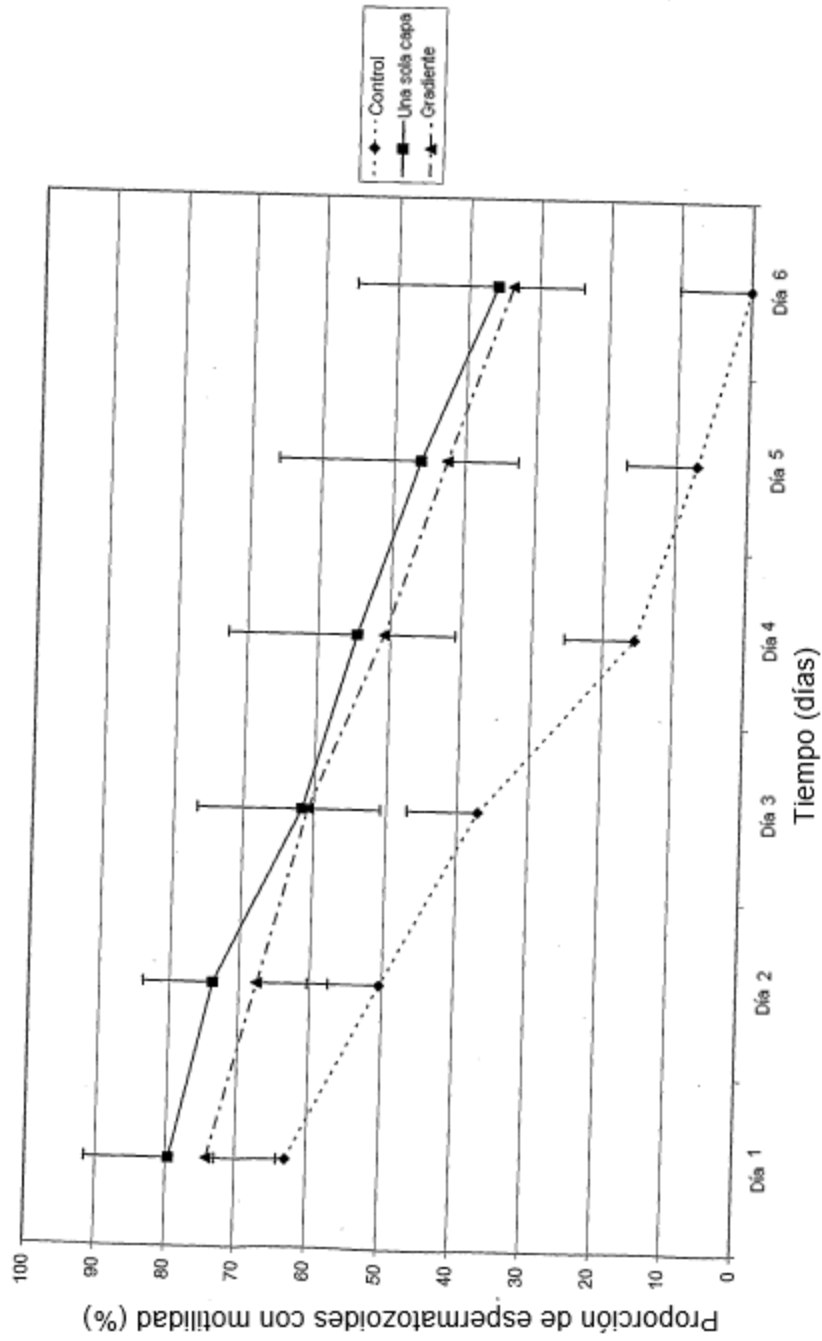
Nota: el día 1 es el día de la preparación; el día 2 representa el transcurso de 24 horas, etcétera.

Figura 15: Efecto de osmolaridad del coloide sobre la motilidad del espermatozoide de jabalí después de la centrifugación con gradiente de densidad en tubos de centrifuga pequeños y grandes: osmolaridad = 330 mOsm (n = 8).



Nota: el día 1 es el día de la preparación; el día 2 representa el transcurso de 24 horas, etcétera.

Figura 16: Comparación de la centrifugación con gradiente de densidad y la centrifugación en una sola capa de espermatozoides de jabalí (n = 12 eyaculados).



Nota: el día 1 es el día de la preparación; el día 2 representa el transcurso de 24 horas, etcétera.

Figura 17: Efecto de la incubación a 37 °C sobre la motilidad de espermatozoides de jabalí de preparaciones de una sola capa (n = 18 eyaculados).

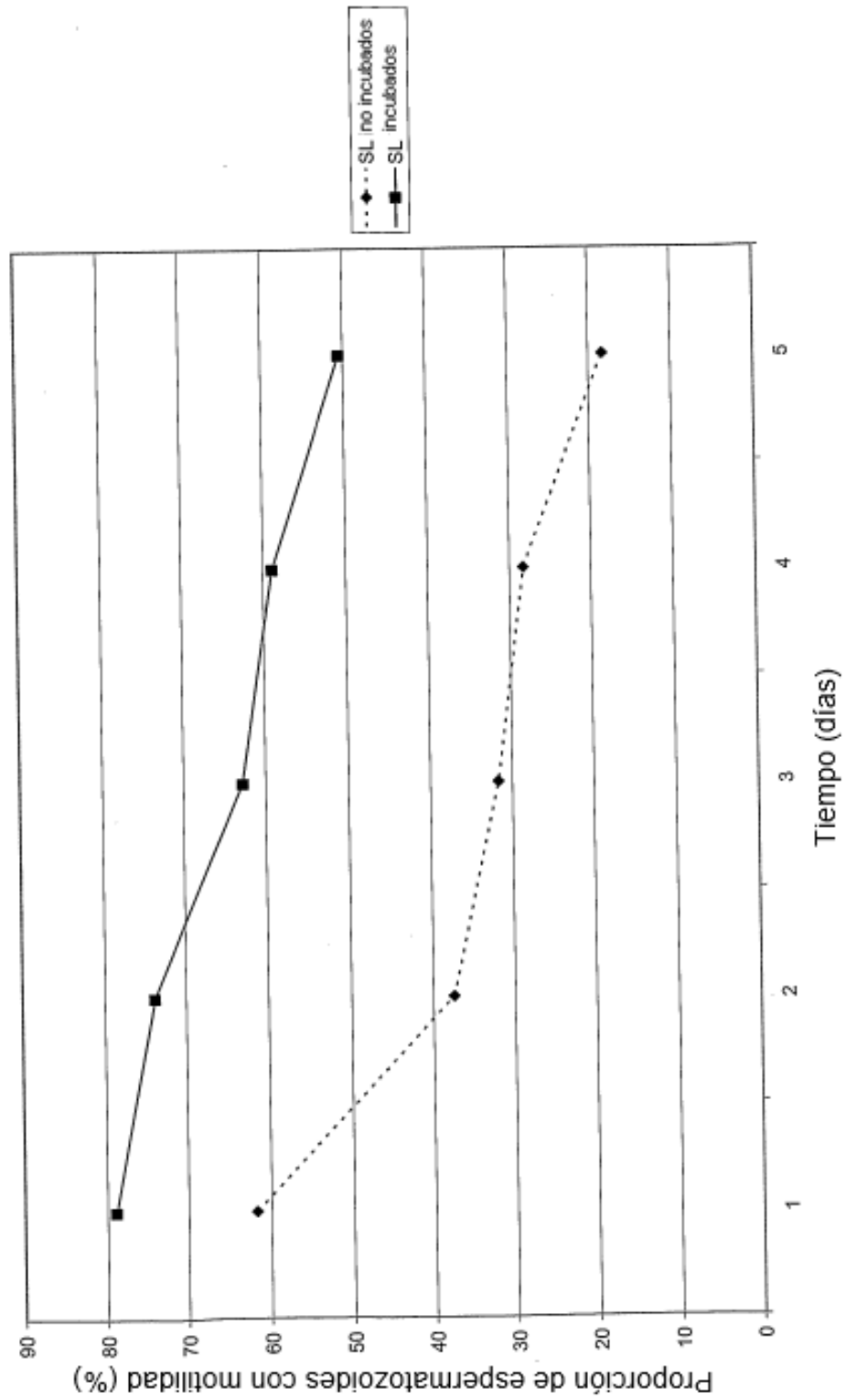


Figura 18: Comparación de la centrifugación coloidal con el uso de espermatozoides de jabalí frescos y almacenados (n = 12 eyaculados).

