



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Selección del sexo en el ganado porcino:
análisis de factores limitantes y desarrollo de
estrategias eficientes.**

David del Olmo Llanos

2014

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1. **Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques (2012).** Parrilla I, del Olmo D, Sijes L, Martinez-Alborcia MJ, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. Anim Repro Sci 132: 66–73.
2. **The effect of glycerol concentrations on the post-thaw in vitro characteristics of cryopreserved sex-sorted boar spermatozoa (2012).** Parrilla I, del Olmo D, Caballero I, Tarantini T, Cuello C, Gil MA, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM. Reprod Dom Anim 47: 965–74.
3. **Handling of boar spermatozoa during and after flow cytometric sex-sorting process to improve their in vitro fertilizing ability (2013).** del Olmo D, Parrilla I, Gil MA, Maside C, Tarantini T, Angel MA, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM. Theriogenology 80: 350–6.
4. **Successful laparoscopic insemination with a very low number of flow cytometrically sorted boar sperm under field conditions (2014).** del Olmo D, Parrilla I, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Angel MA, Tarantini T, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, Roca J, Vazquez JM, Martinez EA. Theriogenology 87: 315–20

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria
Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum"
Universidad de Murcia

*Este trabajo ha sido financiado por
el Ministerio de ciencia y Tecnología
(AGL2008-04127/GAN; RYC-2008-02081),
la Fundación Séneca (04543/GERM/07) y
Sexing Technologies (Navasota, Texas, USA).*

*A mis abuelos, Pepe y Joaquina,
mis padres, Luis y Amparo
y mi hermano, Luis.*

Marta y Pablo.

Agradecimientos

Una vez finalizada esta etapa de mi vida, me veo en la obligación de enfrentarme a la parte más difícil de la tesis doctoral, que no es otra que los agradecimientos. A priori, parece ser la más sencilla, ya que es la única parte en la que se permite la subjetividad, y las afirmaciones no necesitan referencias o datos que las apoyen, pero es difícil encontrar palabras para expresar mi gratitud a todas las personas que han hecho posible la finalización de este trabajo. Por eso quiero dar las gracias a:

Dr. Juan María Vázquez, gracias por cambiar mi vida y ofrecerme esta gran oportunidad, por permitir formar parte de esta gran familia y dejarme en buenas manos. Te estaré eternamente agradecido por confiar en mí para este proyecto.

Dr. Emilio Martínez, por ser director de esta tesis, por tu sabiduría, tu sentido del humor y tu buen corazón. Por convertir cada trabajo en una verdadera obra de arte y sobre todo, por mantenernos unidos como a una gran familia.

Dra. Inmaculada Parrilla, por ser mi directora y mi amiga. Gracias por toda tu ayuda, amabilidad, las horas que has dedicado a nuestro trabajo y por que no perdiera la ilusión cuando me faltaban las fuerzas. Aunque seas "mi referee más exigente", has convertido esta experiencia en algo maravilloso y me siento dichoso de poder considerarte mi amiga.

Dr. Jordi Roca, por ser además de un buen jefe, un buen amigo. Gracias por cada sabio consejo, por tu trato personal y tu afecto.

Dra. Xiomara Lucas, Dra. María Antonia Gil, Dra. Cristina Cuello, por vuestra ayuda, vuestro ánimo y sobre todo por vuestros valiosos consejos, tanto en el trabajo como en la vida.

Dr. José Luis Vázquez, por sus enseñanzas y por sacar tiempo para ayudarnos en esas tardes calurosas de operaciones en la granja.

Tatiana Tarantini, por ser mi amiga y principal apoyo estos años. Le doy gracias a Dios, Inma y Juan María por todo el esfuerzo para que estuvieses a mi lado. Gracias por todo tu trabajo, por cuidar a Marta y por traernos un sobrino.

Mis compañeros de despacho, por todos los buenos momentos compartidos en estos años. A Jesús, porque aunque estemos todo el día dándonos los espaldas sabes que te quiero, gracias por todos los momentos de locuras y de risas. A Diego, mi brasileño favorito (después de Pietro), gracias por ser tan buen compañero y un trabajador incansable. Aunque nos separen miles de kilómetros, nuestras

familias estarán unidas por siempre. A Miguel Ángel, por ser el mejor bailarín del mundo, por toda tu ayuda, tu alegría y los buenos momentos vividos en estos años, siempre conseguirás lo que te propongas. Carmen Ródenas, por todo tu cariño, apoyo y las largas conversaciones juntos, sabes que eres especial. A "Las Niñas": Isabel, Cristina P, Cristina M y Alicia, por traer ilusión, alegría y energías renovadas al departamento. Lola, por toda su ayuda en estos años y estar siempre la primera en el departamento. María José y Alfonso, por permitirme seguir aprendiendo cada día.

A los que están lejos y siguen siendo de esta gran familia: Carolina, por toda tu ayuda, por los abrazos "chillaos", por escucharme y animarme siempre que te he necesitado. A Jonatán, por ser un buen amigo y mejor profesor, porque cada momento a tu lado fue un continuo aprendizaje. A Carmen y Nacho, por ser un ejemplo a seguir, por su ayuda y apoyo constante.

First of all, I am very grateful to Sexing technologies, for the financial support of this work. I would like to mention and especially thank Mike Evans, for such a friendly contribution and also for teaching me everything about flow cytometry. I also would like to thank everyone else i met in Navasota (Clara, Ticiano, Mike Kjelland, Tom, Chelsie, Ashley, Chad, Jared, Dr. Lenz, JC Samper...) for the encouragement, support, for being such a good colleagues and making my stay there a great experience. A toda mi familia Texana, Amber, Teresa, Carlos, Mario Delgado, Gina, Eddy, Adrienne, Ever y Mario Peralta, Jorge, Marta, Gustavo...por hacerme sentir como en casa, por los increíbles momentos juntos, por el maravilloso verano... ¡YA SE ARMÓ!

Desidero ringraziare il Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali, tutti i ragazzi dello staff di ricerca (Cinzia, Danilo, Antonio, Chiara, Andrea, Nadia, Augusta...) per tutto l'aiuto fornito. Un sentito ringraziamento ai professori Eraldo Serén, Carlo Tamamini, Giovanna Galeati, Marcella Spinaci, per la grande disponibilità e cortesia dimostratemi, e per tutto quanto hanno fatto per me durante il periodo di stage. Un ultimo ringraziamento ai compagni di ufficio, Elisa, Fabrizio e Diego Bucci, sono stati per me più veri amici che semplici compagni. Muchas gracias a Tania, Savino, Thomas, Peter y en especial Angela Malavenda, por ayudarme a conocer Bolonia, las largas conversaciones, las tardes de piano y hacerme sentir como en casa.

AIM Ibérica, por la aportación de muestras biológicas sin las cuales no hubiera sido posible realizar este trabajo. A mis compañeros, José Ramón, Sergio, Paco Ruíz, Eusebio, Paco Béjar...por alargar un poco su jornada laboral y permitirnos tener muestras de excelente calidad.

Agropor SL, por su colaboración inestimable y muy especialmente a sus trabajadores, José Manuel "Menor", Paco, Antonio Morell, Jorge, José Manuel "Mayor", Juan Conesa...por su ayuda constante y por facilitarnos trabajo en la granja.

A las Industrias Fuertes-El Pozo S.A, por facilitarnos el material biológico para realizar estas experiencias.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación por concederme la beca-contrato FPI y las dos estancias breves que he disfrutado.

Mis compañeros de la carrera, por esos inolvidables momentos vividos y por seguir juntos arreglando el país después de tanto tiempo. Pepe, Lorenzo, Mario, Arturo, Ximo, Chema, Joel, Salva, Ale, Fran, Jumillano...

Mis amigos manchegos, Ángel, Fernando, Servando y Olmo, por vuestra amistad, por ser incondicionales y por soportar largas conversaciones sobre la citometría de flujo.

Mi familia, mis padres Luis y Amparo, por todo vuestro esfuerzo y sacrificio durante estos años, por enseñarme a no rendirme, porque os debo todo lo que soy y he logrado. A Luis, mi hermano y amigo, por toda tu ayuda, por empeñarte a que viniera al mundo y guiarme en el camino. A mis abuelos, Pepe y Joaquina, porque aunque no puedan leer esta tesis, siempre estarán orgullosos de sus nietos. A mi familia política-adoptiva, por todo su cariño durante estos años, sabios consejos y hacerme sentir uno más.

Gordo Golden, por empezar el doctorado conmigo, estar a mi lado cuando necesitaba inspiración, por tu alegría incondicional y lo mucho que me has enseñado.

Marta, porque contigo comenzó la gran aventura de mi vida. Solo tú sabes todo lo que hay detrás de esta tesis. Gracias por las correcciones, por compartir los buenos y los malos momentos, por estar a mi lado cada día, por ser mi gran apoyo, por hacerme feliz, por quererme y por la maravillosa familia en la que nos hemos convertido. Te quiero.

Pablo, por hacerme sentir un sentimiento nuevo que nada tiene que ver con la amistad profunda o el amor romántico. Solo con mirarte me das fuerzas para seguir y me haces sentir que puedo. Te has convertido en el centro de nuestro universo. Gracias por estar a mi lado mientras escribo estas palabras.

"Si he logrado ver más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes"

Sir Isaac Newton (1643-1727)

"La ciencia es una de las grandes aventuras de la raza humana, tan fantástica y exigente como los cuentos de héroes y dioses, naciones y estados, escritores y poetas... esa es mi convicción y pienso que la ciencia podría y debería ser enseñada de manera tal que se transmita una sospecha de ese espíritu a la mente del estudiante"

Max Born (1882-1970)

INDEX / ÍNDICE

Introduction.....	1
Objectives.....	7
Extended Summary	11
Conclusions.....	27
Introducción	31
Objetivos	37
Resumen General	41
Conclusiones	59
Abbreviations / Abreviaturas	63
References / Referencias	67

Articles / Artículos	75
<i>Article 1 / Artículo 1.....</i>	77
<i>Article 2 / Artículo 2</i>	81
<i>Article 3 / Artículo 3</i>	85
<i>Article 4 / Artículo 4</i>	89

INTRODUCTION

Sex pre-selection of the offspring by using X or Y chromosome bearing spermatozoa sorted by flow cytometry is nowadays a reality. However, while sexed spermatozoa are commercially available for bovine, in other domestic species including the pig the technique is still at experimental level. Although the application of the technology would have a significant impact on swine production, as it allows planned mating for a specific sex of piglet and speedup the rate of swine genetic progress, its commercial application is null. Several factors have prevented its use in pigs, unlike other livestock. Sex sorting by flow cytometry involves a number of stressful steps for the spermatozoa, which can determine a decrease in its functionality and lifespan. These stressors include exposure to Hoechst 33342 (H-42) stain, abrupt dilution to extreme levels, physical stress from exposure to high pressures, exposure to intense ultraviolet (UV) light, sudden changes in medium and subsequent centrifugation to concentrate the sperm for further processing (reviewed by Bathgate. 2008). The high sensitivity of boar sperm to the process of sorting compared to other species (Rath and Johnson. 2008; Vazquez et al. 2009) and the current yields of the sperm sorters available today (20 million spermatozoa of each sex sorted per hour) have negatively contributed to the use of this technology by the pig industry.

It is known the high variability among boars in sperm quality when their semen is subjected to cryopreservation procedures (Roca et al. 2006). Therefore, it could be expected that different boars also showed different ability to withstand the sorting processing. Although boar-specific differences in sperm ability to resist sex sorting have not been reported, these differences have been observed in bulls (Boe-Hansen et al. 2005) and horses (Rath and Johnson. 2008). In this context, boars housed in artificial insemination (AI) centers are selected for good semen preservation in liquid stage, but, to date, there is no evidence that boars classified as “good” sperm preservers for the liquid state are also “good” preservers for sex-sorted spermatozoa. The identification and pre-selection of boars according to their capacity to sustain their sperm functionality after sorting process could be an important goal to improve the effectiveness and efficiency of sex-sorting boar sperm technology.

Since the farms are usually located far from the sorting laboratories and relatively long storage periods could be required from sorting to insemination (Vazquez et al. 2009), combination of sperm sex sorting and cryopreservation is presented as a suitable strategy to the commercial application of that technology. However, the poor freezability of sex-sorted boar spermatozoa has been considered one of the most important limitations of using sex-sorting technology in pigs, especially when compared with other species (Rath and Johnson. 2008; Vazquez et al. 2009). Several attempts to freeze sex-sorted boar sperm have been reported, but fertility results obtained in these studies have been extremely poor (Bathgate et al. 2007 and 2008). For the successful cryopreservation of sex-sorted boar spermatozoa and to increase their functionality after thawing, it is necessary to adjust the standard spermatozoa cryopreservation procedures according to the specific requirements of this type of spermatozoa. The concentration of glycerol used during freezing could be one of these critical

adjustments. Despite its importance as a cryoprotectant, glycerol has toxic chemical and osmotic effects on sperm (Woods et al. 2004) that can cause decreases in post-thaw sperm motility and viability with a subsequent decline in the fertilizing ability. Moreover, the negative effects of glycerol could be related to the number of spermatozoa present in the samples prior to freezing, as previously reported for other species (Evans and Maxwell. 1987; Beilby et al. 2010). Currently, due to the limited number of available sex-sorted spermatozoa per unit of time it has been necessary to develop new insemination strategies for low or very low sperm number (Vazquez et al. 2008) and, in the case of frozen sperm, to reduce the number of spermatozoa per straw to adapt it to the number of spermatozoa required per insemination. Therefore, the evaluation of the effects of freezing at low sperm number together with the effects of glycerol concentration on the quality of sex-sorted sperm is necessary to modify the current cryopreservation protocols and to get optimal results from the combination of both technologies in swine.

Despite a sustained improvement has been obtained by adjusting the cryopreservation conditions, results from our laboratory indicate that the *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved sex-sorted sperm is compromised. As an alternative, and for the short-term application of the sorting technology in pig production, efforts should be put to improve the use of fresh sex-sorted sperm. As mentioned before, the sex-sorting procedure produces a population of weak, highly diluted spermatozoa with a reduced lifespan (Maxwell and Johnson. 1997; Caballero et al. 2008; Spinaci et al. 2010) and fertilizing ability (Parrilla et al. 2005). Several studies have been focused on the collection medium, as stabilizing and protecting agent for sorted boar spermatozoa, in an attempt to decrease the harmful effects of the high sperm dilution rates and/or the own sorting process (Johnson et al. 1991; Rath et al. 1997; Maxwell et al. 1997). Most commonly, the collection medium used for sex-sorted boar sperm is TES-Tris-Glucose medium supplemented with 2% egg yolk and 10% seminal plasma as described by Johnson et al. (1999). The use of collection media containing egg yolk and/or seminal plasma, as protective agents, is widely accepted because improves the quality of sorted boar sperm (Rath et al. 1997; Parrilla et al. 2005; Spinaci et al. 2010). However, the available information about the influence of the collection media's components on *in vitro* fertilizing ability of sorted boar sperm is scarce. In addition, during flow cytometric sorting, sample stream carrying the sperm cells is surrounded by another stream fluid, the sheath fluid, which constitutes the main component of the collected sample after sorting. Therefore, the use of an appropriate sheath fluid is critical to diminish the negative effect of high dilution rates (Klinc and Rath. 2007). Several studies have supplemented sheath fluid with different antioxidants and assessed their effects on the quality of bull spermatozoa (Klinc and Rath. 2007; Klinc et al. 2007), demonstrating that an improvement in the sheath fluid can minimize cell stress. However, to the best of our knowledge, there are no studies of the effects of sheath fluid composition on the quality and functionality of sorted boar sperm. For this reason, the

development of an adequate handling protocol during and after sorting in an attempt to increase the fertilization ability of sex-sorted spermatozoa could be an important achievement for the spread of this technology.

Although the efficiency of the sorting procedure has increased considerably in recent years, the current outputs of sorting machines (Sharpe and Evans. 2009) are insufficient for standard pig AI, which usually requires $2\text{--}3 \times 10^9$ sperm per insemination (Martinez et al. 2005; Alm et al. 2006; Reicks et al. 2008). A new procedure for deep uterine insemination (DUI) with a low number of sperm (Martinez et al. 2002) is now commercially available. When DUI was performed with 50 to 140×10^6 sex-sorted sperm per insemination, acceptable farrowing rates and litter sizes were achieved (Vazquez et al. 2003; Rath et al. 2003; Grossfeld et al. 2005); however, these rates were still far from those necessary for commercial use. The laparoscopic insemination (LI) technique has been proposed as a useful alternative for insemination with a very low number of spermatozoa in swine (Vazquez et al. 2008). Using LI, satisfactory fertilization rates were achieved with $5\text{--}10 \times 10^6$ unsorted sperm in the tip of each uterine horn (Fantinati et al. 2005) or with 0.3×10^6 sex-sorted sperm in the oviductal ampulla (Garcia et al. 2007). However, the embryos were collected 1–5 days after LI in these studies, and the sows were not allowed to farrow; therefore, no data are available on the reproductive performance of sows when LI is performed with a very low number of sex-sorted sperm. In addition, important aspects of this procedure remain undefined. For this reason, to develop a successful procedure for LI with sex-sorted boar spermatozoa that yield adequate fertility results under farm conditions will help to achieve more efficient application of this technology.

OBJECTIVES

The main objective of this thesis was to develop a protocol to efficiently apply flow cytometric sex-sorting procedure on boar spermatozoa. For that, we proposed the following specific objectives:

1. To examine the ability of ejaculated spermatozoa from individual boars to withstand flow cytometric sex-sorting procedure (Article 1).
2. To optimize protocols for cryopreservation of sex-sorted boar spermatozoa (Article 2).
3. To design and adequate protocol for boar sperm handling during and after sperm sex sorting for obtaining sex sorted boar sperm with an optimal in vitro fertilizing ability (Article 3).
4. To develop a useful procedure for laparoscopic inseminations with sex-sorted spermatozoa that allows obtaining optimal fertility results at a farm level (Article 4).

EXTENDED SUMMARY

MATERIAL & METHODS

1. Biomedical ethics

All experimental procedures in the present study were carried out in accordance with the 2010/63/EU EEC Directive for animal experiments and were reviewed and approved by the Ethical Committee for Experimentation with Animals of the University of Murcia, Spain.

2. Animals

Healthy and sexually mature boars with proven fertility were used in this study. Boars were housed in individual pens with controlled temperature, and free access to water. Semen was collected from boars twice a week at the AI Center, AIM Iberica (Calasparra, Murcia, Spain).

Crossbred sows from a commercial farm (Agropor S.L., Murcia, Spain) were randomly selected on the day of weaning and allocated individually to crates in a mechanically ventilated confinement facility and fed with a commercial ration twice a day. Food was restricted for 24 h before surgical procedures.

3. Collection of the ejaculates

The sperm-rich ejaculate fractions (SREFs) were collected using the gloved hand method, diluted (1:1) in Beltsville Thawing Solution (BTS) and transported to the laboratory at 20-22 °C within 2 hours of collection. Only ejaculates with good sperm characteristics were used in the experiments.

4. Semen processing

a) *Liquid-stored semen*

The semen samples from the diluted SREFs were further diluted with BTS to 3×10^7 sperm/mL, dispensed into 100 mL plastic bags, and stored at 17 °C in a semen incubator.

b) *Sorted semen*

The semen samples from the diluted SREFs were diluted with BTS to 100×10^6 sperm/mL, stained with 5 μ L of H-42 (5 mg/mL) and incubated in a water bath at 35 °C for 50 min in the dark (Parrilla et al. 2005). The sperm samples were then filtered through a 30 μ m nylon mesh filter (Partec CellTrics, Gorlitz, Germany), and 1 μ L of FD&C Red #40 food coloring solution (1 mg/mL; Warner-Jenkinson, South Plainfield, NJ, USA) was added to identify the dead spermatozoa in the sample. The spermatozoa were sorted using the Beltsville Sperm Sorting Technology (Johnson et al. 1989), as adapted for high-speed sorting with a flow cytometer (MoFlo SX, Dako Colorado, Fort Collins, Colorado, USA) that was equipped with a UV laser set to 175 mW output (351–364 nm; Spectra Physics 1330, Mountain View, California, USA). Samples were sorted using Phosphate Buffered Saline medium (PBS) described by Catt et al. 1997 (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 , with 0.058 g/L penicillin G, and 0.05 g/L streptomycin sulfate; pH 7–7.1, 285–310 mOsmol/kg) or PBS supplemented with 0.1% EDTA (PBS-EDTA) as sheath fluid, depending of the experiments. X-chromosome-bearing sperm were collected (20×10^6 sperm per tube) in 50 mL tubes that were pre-coated with BSA (1%, w:v) and contained 2.5 mL of different collection media depending on the experiment. The sorted spermatozoa were centrifuged at $3000 \times g$ for 4 min. The pellets were re-suspended to different sperm concentrations and stored as a liquid or frozen according to the experiments.

c) *Frozen semen*

Conventional cryopreservation

Diluted SREFs were centrifuged for 3 min at $2400 \times g$, and the sperm pellets were cryopreserved using the straw freezing procedure described by Hernandez et al. (2007). Briefly, the sperm pellets were diluted in a basic freezing medium (LEY; 80% [v:v] β -lactose, 20% [v:v] egg yolk, and 100 μ g/mL of kanamycin sulfate, at pH 7.2 and 312 ± 6 mOsmol/kg) to a concentration of 1.5×10^9 sperm/mL, cooled to 5 °C at 0.08 °C/min and, then, further diluted with the second freezing extender (LEYGO; 89.5% LEY, 1.5% Equex STM [Nova Chemical Sales, Scituate, MA, USA], and 9% glycerol [v:v], at pH 6.2 and 1.715 ± 15 mOsmol/kg) to a final concentration of 1×10^9 cells/mL. The re-suspended and cooled sperm were packed into 0.5 mL straws and frozen using a controlled-rate freezing instrument. The straws remained in the liquid nitrogen tank for at least 2 weeks before they were thawed in a circulating water bath at 37 °C for 20 s. The thawed semen samples were diluted in BTS (1:1, v:v) and incubated in the dark at 37 °C for different periods of time before evaluation depending on the experiments.

Sex sorted sperm cryopreservation

Sorted sperm pellets were diluted in LEY to a concentration of 30×10^6 sperm/mL, cooled to 5 °C and diluted with LEYGO to 20×10^6 sperm/mL. The samples were then packed into 0.25 mL straws and frozen in liquid nitrogen vapours. The straws were stored and thawed as described above for the frozen thawed semen. The thawed, sorted semen was diluted and incubated, as described above for the frozen-thawed semen.

5. Assessment of sperm parameters

a) Sperm motility

Sperm motility was objectively evaluated using a computer-aided sperm analysis system (ISAS®; Proiser R+D, Paterna, Spain) according to the procedure described by Cremades et al. (2005). Prior to the assessment of sperm motility, spermatozoa were carefully re-extended with BTS to $15\text{--}20 \times 10^6$ sperm/mL and were equilibrated for 5 min at 37 °C. Briefly, aliquots of 4 µL from each experimental group were loaded in a pre-warmed (38 °C) Makler counting chamber and were immediately transferred to the pre-warmed stage (38 °C) of a light microscope equipped with phase contrast optics. A total of 6–9 fields of view were analysed, and a minimum of 400 sperm per sample was evaluated. Before the track sequence was analysed, the trajectory of each spermatozoon identified and recorded in each field was visually assessed to exclude possible debris and to diminish the risk that nuclear tracks were included in the analysis. The following two motility parameters were measured: the total motility (the percentage of spermatozoa with an average path velocity of >20 µm/s) and the progressive motility (the percentage of spermatozoa with a straight-line velocity >40 µm/s, linearity $>50\%$ and straightness $>75\%$) (Schmidt and Kamp, 2004).

b) Sperm viability

Sperm viability was evaluated by simultaneous assessment of plasma membrane and acrosome integrity using a triple-fluorescence procedure described by Martinez-Alborcia et al. (2012). Briefly, aliquots containing 2×10^6 sperm were transferred into culture tubes containing 2 µL H-42 (0.05 mg/mL in PBS), 2 µL propidium iodide solution (PI, 0.5 mg/mL stock solution in PBS) and 2 µL fluorescein-conjugated peanut agglutinin (PNA-FITC, 200 µg/mL stock solution in PBS). Samples were mixed and incubated in the dark at 37 °C for 10 min. Immediately before analysis, 400 µL of PBS was added to each sample. The analysis was performed at room temperature under a dim light using a BD FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA)

equipped with three excitation lasers: blue (488 nm, air cooled, 20 mW solid state), red (633 nm, 17 mW HeNe), and violet (405 nm, 30 mW solid state). Data were acquired using BD FACSDiva Software (Becton Dickinson & Company). Non-sperm events were gated out based on H-42 fluorescence (DNA content) and data acquisition was terminated after 10000 H-42 positive events were recorded. The fluorescence spectrum of H-42 was detected with a 450/50 nm band-pass (BP) filter, while the fluorescence spectra of PI and PNA-FITC were detected with a 670 nm long-pass (LP) and a 530/30 BP filter, respectively. Analyzed spermatozoa were categorized into four populations: (1) intact plasma membrane and acrosome (PI-/FITC-PNA-), (2) intact plasma membrane and damaged/reacted acrosome (PI-/FITC-PNA+), (3) damaged plasma membrane and intact acrosome (PI+/FITC-PNA-), or (4) damaged plasma membrane and acrosome (PI+/FITC-PNA+). Only viable spermatozoa (those exhibiting intact plasma membrane and acrosome (PI-/FITC-PNA-) and sperm with a damaged/reacted acrosome (FITC-PNA +) were included in statistical analyses.

c) Sperm DNA integrity

The sperm chromatin dispersion test was used to determine the DNA fragmentation index (DFI) in boar spermatozoa. For this purpose, samples were treated using the commercial kit Sperm-Sus-Halomax® for fluorescence microscopy (Halotech DNA SL., Madrid, Spain), according to the protocol included with the kit. A 25 µL sperm sample with a total of 500000 spermatozoa was added to the vial containing liquefied agarose and was mixed thoroughly using a vortex mixer. A drop of the cell suspension was placed on an agarose pre-treated slide, covered with a glass coverslip and placed at 4 °C for 5 min. The coverslip was carefully removed, and the slide was positioned horizontally in 10 mL of the lysing solution at ambient temperature. After 5 min, the slides were washed in distilled water, dehydrated in sequential 70%, 90% and 100% ethanol baths for 2 min each, air dried and preserved in darkness until dying. Finally, the cells were stained using 5 µL of a 0.01 mM solution of PI for 5–10 min at 37 °C in darkness immediately prior to the analysis under fluorescence. A minimum of 500 spermatozoa per slide was examined in random fields of view and was classified as spermatozoa with fragmented DNA (i.e. the cells displayed a large and spotty halo around the sperm head) or spermatozoa with non-fragmented DNA (i.e. no halo was present surrounding sperm head) according to the kit instructions.

d) Sperm membrane lipid peroxidation

Sperm membrane lipid peroxidation (LPO) was assessed by indirectly measuring Malondialdehyde (MDA) generation using the BIOXYTECH MDA-586 Assay Kit (OxisResearch, Burlingame, CA, USA). The processed semen samples were BTS-diluted (3×10^6 spermatozoa) and incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 1 μL of Fe_2^+ /ascorbate solution (11 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 40 mg sodium ascorbate in 10 mL of distilled water) to promote the LPO cascade and MDA release. The incubated sperm sample (50 μL) was mixed with 2 μL of probucol, 160 μL of 1-methyl-2-phenylindole (diluted in acetonitrile/methanol [3:1, v:v]) and 37.5 μL of 12 N HCl, incubated at 47 °C for 60 min, and centrifuged at $10000 \times g$ for 10 min to pellet the precipitate. A 200 μL aliquot of the clear supernatant was collected and transferred to a 96-well flat-bottom transparent plate. A calibration curve prepared from an MDA stock (1,1,3,3-tetramethoxypropane) was included on the plate, and the absorbance at 586 nm was read on a spectrophotometer. The LPO index was calculated as the micromoles of MDA per 30×10^6 sperm. This assay was performed in triplicate for each sample.

*e) In vitro fertilization assay**Culture media*

The medium used to collect and wash cumulus-oocyte complexes (COCs) was Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) medium composed of 136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 and 1.46 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and supplemented with 4 mg/mL BSA, 0.34 mM sodium pyruvate, 5.4 mM D-glucose and 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin (mDPBS). The oocyte maturation medium was BSA-free North Carolina State University (NCSU-23) (Petters and Wells, 1993) supplemented with 10% porcine follicular fluid (v:v), 0.8 mM cysteine, 10 ng/mL epidermal growth factor and 5 nM 9-cis retinoic acid. The basic medium used for in vitro fertilization was essentially the same as that used by Abeeydera and Day (1997). This medium, designated as modified Tris-Buffered medium (mTBM), consisted of 113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, 11 mM glucose and 5 mM sodium pyruvate, supplemented with 2 mM caffeine and 0.2% BSA. The embryo culture medium was sequential medium based on NCSU-23 supplemented with 0.4% BSA.

In vitro maturation

Ovaries were obtained from prepuberal gilts at a local slaughterhouse and transported to the laboratory at 35 °C within 1 h of collection in 0.9% NaCl containing 70 µg/mL kanamycin. After the ovaries were washed three times in NaCl solution, follicles 3 to 6 mm in diameter were aspirated using an 18-ga needle connected to a 10 mL disposable syringe. Oocytes with a compact cumulus mass and dark, evenly granulated cytoplasm were washed three times in maturation medium and matured in a 4-well multidish containing 70–80 COCs per well in 500 µL maturation medium supplemented with 10 IU/mL of equine chorionic gonadotropin (eCG) and 10 IU/mL of human chorionic gonadotropin (hCG) for 20–22 h and then for additional 20–22 h in maturation medium without hormones. Oocyte maturation was carried out under mineral oil at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. After maturation, COCs were denuded with 0.1% hyaluronidase in maturation medium by vortexing for 2 min, 1,660 rounds/min, and washed twice in maturation medium and three times in pre-equilibrated fertilization medium.

In vitro fertilization

Groups of 30 denuded oocytes were placed in 50 µL drops of fertilization medium in a 35 × 10 mm Petri dish under mineral oil and incubated at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air for 30 min until the addition of spermatozoa. Sperm samples were centrifuged at 3,000 × g for 4 min. After removal of the supernatant the pellets were re-suspended with 1 mL of pre-equilibrated warm mTBM. The resulting pellet was re-suspended in mTBM and after an appropriate dilution, 50 µL of this sperm suspension was added to a 50 µL drop of fertilization medium containing the oocytes. The spermatozoa:oocyte ratio was 1000:1. Gametes were co-incubated at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air for 5 h.

Assessment of sperm penetration

To assess the fertilization parameters, presumptive zygotes were mounted onto slides, fixed with acetic acid:ethanol (1:3, v:v) for 48–72 h at room temperature, stained with 1% lacmoid in 45% (v:v) acetic acid and examined under a phase contrast microscope at a magnification × 400. Fertilization parameters were evaluated 16–18 h after insemination. Oocytes were considered penetrated when they contained one or more swollen sperm heads and/or male pronuclei, with their corresponding sperm tails, and two polar bodies. Immature and degenerated oocytes were not counted. The fertilization parameters evaluated were: (1) penetration rate, defined as the ratio of oocytes

penetrated to the total number of oocytes matured, (2) polyspermy rate, defined as the ratio of oocytes containing two or more male pronuclei to the total number of penetrated oocytes and (3) number of spermatozoa per oocyte, defined as the number of spermatozoa penetrating an oocyte.

6. Laparoscopic insemination

a) Synchronization and superovulation treatments

Superovulation was induced by injecting each female intramuscularly with 1250 IU eCG 24 h after weaning. Sows in oestrus at 72 h post-eCG administration were treated with 750 IU hCG at the onset of oestrus. Oestrous detection was performed twice a day (7:00–17:00), beginning 2 days after eCG injection, by allowing females nose to nose contact with a mature boar and by applying back pressure.

b) Control of ovarian status by trans-rectal ultrasonography

Ovarian status of the sows was examined 30–32 h after the onset of oestrus by transrectal ultrasonography using the protocol described by Bolarin et al. (2009). Both ovaries were checked simultaneously for functional structures such as pre-ovulatory follicles (diameter of antrum > 6 mm), corpora hemorrhagica or corpora lutea. The sizes of the follicles were measured using the calibrated measurement functions of the ultrasound machine software.

The ovaries were examined at 2–3 h before insemination to check the ovarian status and only those sows in preovulatory status were included in the study. Ovarian status was checked again 16–18 h after insemination in order to make sure that all sows had ovulated at an appropriate time.

c) Insemination

The LI trials were conducted under field conditions following the protocol described by Garcia et al. (2007). Briefly, sows were sedated by azaperone (Stresnil®, Lab. Dr. Esteve, Barcelona, Spain) administration (2 mg/kg body weight, intramuscular). General anesthesia was induced with sodium thiopental (7 mg/kg body weight, intravenous) and anesthesia was maintained with isoflurane (3.5–5%). The sow was placed in the Trendelenburg position at an angle of approximately 20° above horizontal. A 1.5 cm incision was made closet to the umbilicus. The edges of the incision were then pulled up with countertraction and a 12-mm Optiview trocar (Ethicon Endo-surgery

Cincinnati OH, USA) with an inserted 0° laparoscope was advanced into the wound. After the peritoneal cavity was entered and the pneumoperitoneum started, the handpiece of the optiview was removed and replaced by the 0° laparoscope. The abdominal cavity was insufflated with CO₂ to 14 mmHg. Two accessory ports were placed in the right and left part of the hemi abdomen, which provided access for laparoscopic Duval forceps for manipulating the genital tract. The oviduct was grasped in the infundibulum area close to the ampulla to inject the sperm dose in the ampullar region in direction to isthmus. The sperm injection was performed using a chiba needle (ref: 95200–22, 22 G/0.7mm x 200 mm. Polymedic®, Temena, France). Before been inserted through the accessory port, the chiba needle was covered with a sterile hard plastic sheath. The uterine horn was grasped 2 cm distal to the uterine tubal junction (UTJ) and the sperm dose was injected 0.8–1 cm from UTJ in direction to isthmus. The procedure was then repeated in the contralateral side. For simple LI, sperm were inseminated only in each oviductal ampulla, while for double LI semen was deposited in the oviductal ampullas and close to the UTJs. After the insemination procedure, the trocars were removed and minor suturing was required.

d) Evaluation of reproductive parameters

The sows were exposed once daily to teaser boars from day 18 through 38 after LI to identify non-pregnant sows. Pregnancy was determined by transabdominal ultrasonography 24 days after LI. Those sows that initially were diagnosed pregnant but showed delayed estrous intervals (longer than 24 d) were considered sows that loss the embryos in early pregnancy stage. Pregnant sows were monitored until term and farrowing rates, litter size, piglets born alive, sex of offspring and birth-weight were recorded.

7. Statistical analysis

All data editing and statistical analyses were performed using the SPSS software package, version 15.0 (SPSS for Windows, 2002, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and differences were considered significant at $P < 0.05$. The data were analyzed by ANOVA with a MIXED procedure (Articles 1, 2 and 3). When the ANOVA revealed a significant effect, the values were compared using the post hoc Bonferroni test. In the article 4, the percentages of sows that returned to estrus, the pregnancy and farrowing rates and the sex of the offspring were analyzed using the Fisher's exact test. The litter size, number of piglets born alive and birth weight were compared using ANOVA or Student's t-test. When ANOVA revealed a significant effect, the values were compared using the Tukey test.

EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS

Objective 1: To examine the ability of ejaculated spermatozoa from individual boars to withstand flow cytometric sex-sorting procedure (Article 1).

Eighteen sperm-rich ejaculate samples from six boars (three per boar) were diluted in BTS and split into three aliquots. The aliquots were (1) further diluted to 3×10^7 sperm/mL and stored as a liquid at 17 °C for 72 h, (2) frozen-thawed (FT) at 1×10^9 sperm/mL using standard 0.5-mL straw protocols, and (3) sex-sorted with subsequent liquid storage (at 17 °C for 6 h) or FT (2×10^7 sperm/mL using a standard 0.25-mL straw protocol). Sperm motility, viability, lipid peroxidation and DNA fragmentation were evaluated after 72 h of storage and 30 min after thawing for liquid-stored semen and FT semen groups, respectively. The quality of sorted semen group was evaluated after staining with H-42 (H-42 stained semen), sorting, storage for 6 h at 17 °C (liquid stored sorted semen) and 30 min of thawing (FT sorted semen).

All of the fresh semen samples showed satisfactory sperm quality upon arrival at the laboratory and no differences among boars were observed. The percentages of total motile and viable sperm were higher than 80%, and the percentage of sperm with fragmented DNA was less than 4% in all semen samples. In addition, in any of the fresh semen samples evaluated MDA generation was higher than 20 μmol MDA per 30×10^6 sperm. All sperm-processing techniques affected sperm quality ($P < 0.01$), regardless of the semen donor, with reduced percentages of motile and viable sperm and increased MDA generation and percentages of sperm with fragmented DNA. Significant ($P < 0.05$) inter-boar (effect of boars within each semen processing technique) and intra-boar (effect of semen-processing techniques within each boar) differences were evident for all of the sperm quality parameters assessed, indicating differences in the ability of spermatozoa from individual boars to withstand the semen processing techniques.

Objective 2: To optimize protocols for the cryopreservation of sex-sorted boar spermatozoa (Article 2).

Experiment 1

In this experiment, we evaluated the effectiveness of a standard boar cryopreservation protocol for freezing sex-sorted spermatozoa at low sperm concentrations. Semen obtained from three different boars (two replicates per boar) was used in this study. Sperm-rich fractions from each ejaculate were divided in two aliquots. One aliquot was processed for flow cytometric sperm sorting and freezing at a low sperm concentration (20×10^6 sperm/mL; S20 group), whereas the remaining aliquot was used to prepare the control groups. The control groups included non-sorted spermatozoa frozen under the same conditions as the sorted spermatozoa (low sperm concentration; C20 group) and spermatozoa frozen according to the conventional boar sperm freezing protocol (high sperm concentration of 1000×10^6 sperm/mL; C1000 group) described above. The total and progressive motility and plasma membrane and acrosome integrity were evaluated at 5 °C prior to freezing and after 30, 90 and 150 min of post-thaw incubation at 37 °C. Sperm DNA integrity was analysed only prior to freezing and at 150 min after thawing.

Results of this experiment indicated that freezing sperm at low concentrations decreased ($P < 0.05$) the total and progressive motility at 90 and 150 min after thawing regardless of whether the sperm were sorted or not. However, the sperm membrane integrity was not affected at any evaluation step. Sperm samples frozen at 1000×10^6 sperm/mL showed higher percentages of spermatozoa with fragmented DNA than either the sorted or non-sorted frozen samples groups. Despite these differences, all of the groups evaluated in this study had very low DFI values ($< 2.5\%$), which indicated the poor biological significance of the results.

Experiment 2

This experiment (2×5 factorial) was conducted to evaluate the effects of different glycerol concentrations on the functionality of sorted and non-sorted boar spermatozoa frozen at low sperm concentrations. The semen donors were the same three boars used in Experiment 1, and similarly, two replicates per boar were performed. Sperm-rich fractions from each ejaculate were split into two aliquots. One of the aliquots was used for sperm sorting (S20 groups), and the remaining aliquot was used in the preparation of the control samples (C20 groups). After the sorting or dilution steps, the

samples were centrifuged, and the pellets were re-diluted and cooled as described above. The samples were further diluted at 5 °C with equal volumes of LEYGO extender to yield final glycerol concentrations of 0.16%, 0.5%, 1%, 2% and 3%, respectively. Sperm characteristics were evaluated at the same times as in Experiment 1.

Significant effects on the total and progressive motility because of increased glycerol concentrations in the S20 and C20 groups were observed only at 90 and 150 min after thawing. The samples frozen in 3% glycerol showed lower ($P < 0.05$) motility values when compared to those frozen in the presence of 0.5% and 1% glycerol. The percentages of viable spermatozoa were not affected by the semen group or glycerol concentration at 30 and 90 min of incubation. As in Experiment 1, non-sorted control samples displayed higher percentages of spermatozoa with damaged DNA than sorted spermatozoa, although the DFI values were lower than 2.5%.

Objective 3: To develop a sperm handling protocol to obtain sex-sorted sperm with optimal fertilizing ability (Article 3).

Experiment 1

This experiment evaluated the quality and fertilizing ability of highly diluted boar sperm samples, mimicking the high dilutions involved in sorting procedure. Unsorted spermatozoa were highly diluted in PBS (HD-PBS group) and BTS (HD-BTS group) to 1×10^6 sperm/mL. High dilution was performed gradually in approximately 60 min at a 21–22 °C. Sperm samples from the same boars diluted to 100×10^6 sperm/mL in BTS were used as the control. All samples were incubated during 10–15 min at a 21–22 °C before being evaluated.

No differences among groups were found for any of the sperm quality parameters evaluated, regardless of the dilution rate and the extender used. In addition, high values for all fertilization parameters analyzed were obtained in all groups with no differences among groups.

Experiment 2

In this experiment we analyzed the effects of different types of collection medium on the quality and functionality of sorted sperm. Spermatozoa were sorted using PBS as sheath fluid and collected in three different types of collection media: PBS, TES-Tris-Glucose (TTG), or TTG supplemented with 2% EY (TTG-EY). Control groups consisted of unsorted spermatozoa diluted in PBS to 1×10^6 sperm/mL in presence of PBS, TTG, or TTG-EY, respectively. After processing, all samples were incubated during 10–15 min at a 21–22 °C before being evaluated.

The results of this experiment showed no influence of the sperm treatment (sorted and unsorted), the collection media and the interactions of both factors on sperm quality. However, there was a clear effect of sperm treatment on the *in vitro* fertilization parameters evaluated. The penetration and polyspermy rates and the number of sperm per oocyte penetrated were greatly decreased ($P < 0.001$) in the sorted groups in comparison with those obtained in the unsorted groups. Collection media did not affect fertilization parameters in unsorted sperm. However, a higher penetration rate was obtained when sorted sperm was collected in TTG-EY media compared to PBS or TTG media ($P < 0.05$), although remained lower than 26%.

Experiment 3

This experiment analyzed the effects of sheath fluid composition and determined the most appropriate combination of sheath fluid and collection medium on the quality and functionality of sorted sperm. Spermatozoa were sorted using two different types of sheath fluids (PBS and PBS-EDTA) and collected using three different types of collection media (PBS or PBS-EDTA, TTG, and TTG-EY). Two control groups, consisting of unsorted sperm diluted in PBS or PBS-EDTA to 1×10^6 sperm/mL, were included in this experiment.

Sperm quality parameters in sorted sperm were not affected by the composition of sheath fluid and collection medium. There were no significant differences among controls and sorted sperm groups, regardless of the sheath fluid used. The lowest penetration rates, polyspermy and number of sperm penetrating each oocyte ($P < 0.05$) were noted after sorting sperm with PBS as sheath fluid. When sperm were sorted with PBS-EDTA an effect of collection media was detected and an improvement ($P < 0.001$) in all fertilization parameters was observed when collection media consisted in TTG-EY. Unsorted sperm control groups had high penetration rates ($> 97.0\%$), polyspermy ($> 95.0\%$) and number of sperm penetrating each oocyte (> 6.5). These results were higher ($P < 0.001$) than those achieved in all sorted groups, except to those spermatozoa sorted using PBS-EDTA and collected in TTG-EY, which displayed similar penetration rates (93.7 ± 1.8).

Objective 4: To develop a useful procedure for laparoscopic inseminations with very low number of sex-sorted spermatozoa that allows obtaining optimal fertility results (Article 4).

Experiment 1

The effects of single (oviducts) and double (oviducts and tips of the uterine horns) LI with X-sorted sperm on the reproductive performance of sows were evaluated. Sows ($n = 109$) were randomly distributed into three groups and laparoscopically inseminated using one of the following regimes: (1) single LI with 0.5×10^6 unsorted sperm in each oviduct, (2) single LI with 0.5×10^6 sex-sorted sperm in each oviduct or (3) double LI with 0.5×10^6 sex-sorted sperm in each oviduct and 0.5×10^6 sex-sorted sperm in each uterine horn).

There were no differences among groups in the percentage of pregnant sows; however, this percentage tended ($P = 0.07$) to be higher for the sows inseminated with unsorted sperm. The farrowing rates were lower ($P < 0.05$) in sows inseminated with sex-sorted sperm (43.2% and 61.9% for the single and double insemination groups, respectively) than in sows from the unsorted group (91.3%). Within the sex-sorted groups, the farrowing rate tended ($P = 0.09$) to be greater in sows inseminated using double LI. There were no differences in the litter size among groups. The farrowing rates were higher for the unsorted group than for the sows inseminated with sex-sorted sperm ($P < 0.05$). When the sex-sorted inseminated groups were compared, the sows inseminated in the oviducts and uterine horns using double LI tended ($P = 0.09$) to have higher farrowing rates than the single LI group. In the unsorted and double LI groups, 100% and 86.7% ($P = 0.13$) of the pregnant sows farrowed, respectively; in contrast, a higher proportion (38.7%; $P < 0.04$) of sows inseminated by single LI with sex-sorted sperm lost their pregnancy and experienced an irregular return to estrus (days 27–38). No differences in litter size, the number of piglets born alive or piglet birth weight were observed among groups. The birth sex ratios were 8.8 females for every 10 males ($f = 0.468$) and 122.7 females for every 10 male ($f = 0.924$) for the unsorted and sex-sorted groups, respectively ($P < 0.001$).

Experiment 2

In this experiment we evaluated the effect of the number of sex-sorted sperm on the reproductive performance of sows when using double LI. Sows ($n = 109$) were randomly assigned to the experimental groups and inseminated by double LI using one of the following regimes: (1) 0.5×10^6 sperm in each oviduct and 1×10^6 sperm in each uterine horn or (2) 1×10^6 sperm in each oviduct and 2×10^6 cells in each uterine horn.

High pregnancy (90%) and farrowing (80%) rates were achieved in both groups. The sows inseminated with the highest number of sperm tended ($P = 0.09$) to have more piglets (10.8 ± 0.7 vs. 9.2 ± 0.6). The total sex ratio was 115 female piglets for every 10 male piglets ($f = 0.92$), with no differences between groups.

CONCLUSIONS

1.- There is an individual variability among boars to withstand the sorting procedure by flow cytometry. The response of spermatozoa to a specific semen-processing technique does not predict the response of spermatozoa from the same boar to other semen-processing techniques.

2.- Freezing at low sperm concentration in combination with the use of a final glycerol concentrations of 0.5–1% could be a suitable method for the cryopreservation of sex-sorted boar sperm.

3.- The addition of EDTA to sheath fluid and EY to collection medium improved the in vitro fertilizing ability of sex-sorted sperm, and both agents should be included as essential media components for flow cytometric sperm sex sorting in swine.

4.- The LI procedure described in the present study is an effective method for obtaining offspring of the desired sex in swine at a farm level. The double LI procedure, using between 3 and 6 millions of sex-sorted sperm per sow produces adequate results for reproductive parameters, making sperm-sexing technology potentially applicable in elite breeding units.

INTRODUCCIÓN

La preselección del sexo de la descendencia mediante el uso espermatozoides portadores del cromosoma X o del Y separados por citometría de flujo es hoy en día una realidad. Sin embargo, mientras el semen separado está disponible comercialmente en bovino, en otras especies domesticas, incluyendo el cerdo, la técnica está todavía a nivel experimental. Aunque, la aplicación de esta tecnología podría tener un gran impacto en la producción porcina permitiendo, por ejemplo, la planificación de cubriciones para la obtención de animales de un sexo determinado según las necesidades y un incremento en el progreso genético de las explotaciones, su utilización a nivel comercial es nula. A diferencia de lo que ocurre en otras especies animales, en el caso del ganado porcino son varios los factores que impiden o dificultan esta aplicación.

El proceso de separación espermática mediante citometría de flujo implica una serie de pasos estresantes para los espermatozoides, que pueden comprometer su funcionalidad y su vida útil. Dichos pasos incluyen la exposición al fluorocromo Hoechst 33342 (H-42), las altas tasas de dilución, el estrés físico al someterlos a altas presiones, el impacto de un láser ultravioleta (UV), así como los cambios repentinos en los medios y la posterior centrifugación para concentrar los espermatozoides para su posterior procesamiento (revisado por Bathgate. 2008). La sensibilidad de los espermatozoides de porcino al proceso de separación espermática en comparación con otras especies (Rath y Johnson. 2008; Vázquez y cols. 2009) y los rendimientos actuales de los citómetros de flujo adaptados para la separación espermática (20 millones de espermatozoides de cada sexo por hora) han contribuido de forma determinante a dificultar el uso de esta tecnología en la industria porcina.

Hoy en día es bien sabido que existe una alta variabilidad entre verracos respecto a su calidad espermática cuando su semen es sometido a diferentes técnicas de criopreservación (Roca y cols. 2006). Por tanto, se podría esperar que esta variabilidad se produjera también entre verracos respecto a su capacidad para soportar el proceso de separación por citometría de flujo. Este tipo de diferencias han sido descritas en la especie bovina y equina (Boe-Hansen y cols. 2005; Rath y Johnson. 2008), sin embargo en el caso del ganado porcino no hay evidencias a este respecto. En este punto, hay que señalar que los verracos incluidos en programas de inseminación artificial (AI) son seleccionados por la calidad de sus eyaculados y la respuesta de los mismos a la conservación en estado líquido. Sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencias de que los verracos que son clasificados como “buenos”, debido a que su semen mantiene una calidad óptima tras la conservación en estado líquido, lo son también para resistir el proceso de separación espermática. La identificación y selección de verracos de acuerdo con su capacidad de mantener una buena funcionalidad espermática tras el proceso de separación espermática podría ser un importante logro para mejorar la eficiencia de la tecnología de separación espermática mediante citometría de flujo.

Debido a que las granjas donde se realizan las AI normalmente están localizadas lejos de los laboratorios de separación espermática, y a que son requeridos periodos de almacenamiento relativamente largos para lograr un número de espermatozoides adecuado para una AI estándar (Vázquez y cols. 2009) la combinación de la separación y la criopreservación de espermatozoides, se presenta como una de las estrategias a seguir para posibilitar la aplicación del semen separado en el sector porcino. Sin embargo, la baja resistencia al proceso de congelación que presentan los espermatozoides de porcino separados, ha sido considerada como una de las limitaciones más importantes del uso de la tecnología de separación espermática en esta especie (Rath y Johnson. 2008; Vázquez y cols. 2009), especialmente cuando se compara con otras especies. Aunque han sido publicados varios estudios sobre la congelación de semen separado en porcino, los resultados de fertilidad obtenidos en estos estudios son extremadamente pobres (Bathgate y cols. 2007 y 2008). Por tanto, es necesario adecuar las condiciones de los procedimientos estándar de congelación a las necesidades específicas de los espermatozoides separados con el fin de poder combinar estas dos biotecnologías sin comprometer la funcionalidad de los espermatozoides separados y criopreservados. La concentración de glicerol usada durante la congelación debería ser uno de los puntos críticos en ser adaptado. A pesar de su importancia como crioprotector, el glicerol tiene un efecto tóxico y un efecto osmótico para los espermatozoides (Woods y cols. 2004) que puede causar un descenso en la motilidad y la viabilidad espermática tras la descongelación y, como consecuencia, un descenso en la capacidad de fertilización. Más aún, los efectos negativos del glicerol podrían estar relacionados con el número de espermatozoides presentes en las muestras antes de la congelación, como ha sido previamente descrito en otras especies (Evans y Maxwell. 1987; Beilby y cols. 2010). Actualmente, debido al limitado número de espermatozoides separados por hora que son capaces de conseguir los citómetros de flujo es necesario desarrollar nuevos sistemas de inseminación con un bajo o muy bajo número de espermatozoides (Vázquez y cols. 2008) y, en el caso del semen congelado, reducir el número de espermatozoides por pajuela para adaptarlo al número de espermatozoides requeridos por inseminación. Por tanto, la evaluación de los efectos del proceso de congelación, así como de la concentración de glicerol sobre espermatozoides separados y congelados a bajas concentraciones con el fin de adecuar los actuales protocolos de criopreservación a las particularidades de los espermatozoides separados por citometría de flujo, es un paso necesario para optimizar los resultados derivados de la utilización de espermatozoides de verraco separados y criopreservados.

A pesar de las mejoras sustanciales obtenidas como resultado de las modificaciones de los procesos de criopreservación, hallazgos de nuestro laboratorio indican que la fertilidad *in vitro* de las muestras separadas y congeladas está comprometida. Como una alternativa, y para la aplicación a corto plazo de la tecnología de separación espermática en la producción porcina, es necesario aumentar la utilidad y aplicabilidad del semen separado refrigerado. Como ha sido mencionado

anteriormente, el proceso de separación espermática produce una población de espermatozoides débiles, altamente diluidos, con una reducida vida útil (Maxwell y Johnson. 1997; Caballero y cols. 2008; Spinaci y cols. 2010) y un potencial fértil comprometido (Parrilla y cols. 2005). Diferentes estudios han centrado su atención en los medios en los que los espermatozoides son recogidos tras el proceso de separación y más concretamente en los agentes añadidos a estos medios con el objetivo de proteger y estabilizar los espermatozoides separados de porcino, en un intento de disminuir los efectos dañinos de la alta dilución y de los distintos pasos propios del proceso de separación espermática (Johnson y cols. 1991; Rath y cols. 1997; Maxwell y cols. 1997). El medio de recolección comúnmente usado para los espermatozoides separados de porcino es una solución de TES-Tris-Glucosa suplementado con un 2% de yema de huevo y un 10% de plasma seminal descrito por Johnson y colaboradores en el año 1999. La utilización de medios de recolección con yema de huevo y/o plasma seminal, como agentes protectores de los espermatozoides separados, es ampliamente aceptada porque mejora la calidad de los mismos (Rath y cols. 1997; Parrilla y cols. 2005; Spinaci y cols. 2010). Sin embargo, la información disponible sobre la influencia de los componentes de los medios de recolección sobre la capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides separados de verraco es escasa. Además, durante el proceso de separación espermática, las células espermáticas van inmersas en el chorro de muestra de forma que están rodeadas por un fluido envolvente, o “sheath fluid”, con el cual se mezclan únicamente en el tubo de recogida y que constituye el principal componente de la muestra obtenida tras el proceso de separación. Por tanto, el uso de un fluido envolvente adecuado es un punto crítico para disminuir el efecto negativo de la alta dilución sobre los espermatozoides (Klinc y Rath. 2007). Diferentes estudios describen la suplementación del fluido envolvente con distintas sustancias antioxidantes y los efectos de las mismas sobre la calidad de los espermatozoides de toro separados (Klinc y Rath. 2007; Klinc y cols. 2007), demostrando que una mejora en la composición del fluido envolvente contribuye a minimizar el estrés de las células espermáticas sometidas al proceso de separación por citometría de flujo. Sin embargo, no hay estudios de los efectos de la composición de este fluido envolvente sobre la calidad y funcionalidad de los espermatozoides separados de verraco. Por esta razón, el desarrollo de protocolos adecuados de manejo de los espermatozoides durante y después de la separación espermática, en un intento de incrementar el potencial fértil de los espermatozoides separados, podría ser un importante logro para la difusión de esta tecnología.

Aunque la eficiencia del proceso de separación se ha incrementado considerablemente en los últimos años, los rendimientos de los actuales citómetros (Sharpe y Evans. 2009) son insuficientes para una AI convencional en porcino, para la cual se utilizan entre 2 y 3 mil millones de espermatozoides por inseminación (Martínez y cols. 2005; Alm y cols. 2006; Reicks y cols. 2008). No obstante, un nuevo procedimiento para la inseminación intrauterina profunda (DUI) con un bajo

número de espermatozoides (Martínez y cols. 2002) está comercialmente disponible. Cuando la DUI es realizada con una cantidad de 50–140 millones espermatozoides separados por inseminación, se obtienen tasas aceptables de parto y tamaño de camada (Vázquez y cols. 2003; Rath y cols. 2003; Grossfeld y cols. 2005); sin embargo, estas tasas están aún lejos de aquellas necesarias para su uso comercial. La técnica de inseminación laparoscópica (LI) ha sido propuesta como una alternativa útil para la inseminación con un número muy bajo de espermatozoides en porcino (Vázquez y cols. 2008). Usando LI, se han logrado tasas de fertilización satisfactorias con un número de espermatozoides no separados de entre 5 y 10 millones cuando la inseminación se realizó en el extremo del cuerno uterino (Fantinati y cols. 2005) o con 300000 espermatozoides separados cuando fue realizada en la ampolla oviductal (García y cols. 2007). Sin embargo, en estos estudios los embriones fueron recogidos entre los días 1 y 5 tras la LI y a las cerdas no se les permitió llevar la gestación a término, por tanto no hay datos disponibles sobre los parámetros reproductivos de las cerdas cuando la LI es realizada con un muy bajo número de espermatozoides separados. Además, importantes aspectos de este procedimiento están aún por definir. Por esta razón, desarrollar un procedimiento exitoso de LI con semen separado de porcino que consiga buenos resultados en los parámetros reproductivos en condiciones de granja ayudará a conseguir una aplicación más eficiente de esta tecnología.

OBJETIVOS

La finalidad principal de esta tesis fue desarrollar un protocolo para la aplicación eficiente de los espermatozoides de verraco separados mediante citometría de flujo. Para ello, propusimos los siguientes objetivos:

1. Evaluar la capacidad de los espermatozoides procedentes de eyaculados de diferentes verracos para resistir el procedimiento de separación espermática (Artículo 1).
2. Optimizar los protocolos para la criopreservación de los espermatozoides separados de verraco (Artículo 2).
3. Diseñar un protocolo adecuado para la manipulación de los espermatozoides de verraco durante y después del proceso de separación con el fin de obtener espermatozoides separados con una óptima capacidad fecundante (Artículo 3).
4. Desarrollar un procedimiento útil de inseminación laparoscópica utilizando un número muy bajo de espermatozoides separados por citometría de flujo que permita obtener óptimos resultados de fertilidad a nivel de granja (Artículo 4).

RESUMEN GENERAL

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ética biomédica

Todos los procedimientos experimentales realizados en el presente estudio se llevaron a cabo de acuerdo con la directiva 2010/63/EU EEC para animales de experimentación y fueron revisados y aprobados por el comité ético para experimentación con animales de la Universidad de Murcia (España).

2. Animales

Para la realización de este estudio se utilizaron verracos sanos y sexualmente maduros con fertilidad comprobada. Los verracos estaban alojados en parques individuales con temperatura controlada, y con acceso libre al agua. El semen fue recogido dos veces por semana en el centro de inseminación de AIM Ibérica (Calasparra, Murcia, España).

Las cerdas híbridas utilizadas procedieron de una granja comercial (Agropor S.L., Murcia, España) y fueron seleccionadas al azar el día del destete y alojadas individualmente en jaulas situadas en una nave con ventilación mecánica y alimentadas con ración comercial dos veces por día. La comida se restringió 24 horas antes del procedimiento quirúrgico.

3. Recogida, evaluación y manipulación de los eyaculados

La fracción rica de los eyaculados se obtuvo usando el método de mano enguantada. Una vez recogida se diluyó (1:1) con Belstville Thawing Solution (BTS) y se transportó a 20–22 °C hasta el laboratorio en un tiempo aproximado de 2 horas tras la recogida. Solo eyaculados con unas buenas características de calidad espermática se utilizaron en los experimentos.

4. Procesado del semen

a) Semen refrigerado

Las muestras seminales procedentes de la fracción rica se diluyeron con BTS hasta una concentración de 3×10^7 espermatozoides por mL, se envasaron en bolsas de plástico de 100 mL, y se almacenaron a 17 °C en un incubador de semen.

b) Semen separado

Las muestras de semen se diluyeron en BTS hasta una concentración de 100×10^6 espermatozoides por mL, se tiñeron con 5 µL de H-42 (5 mg/mL) y se incubaron en la oscuridad en un baño de agua a una temperatura de 37 °C durante 50 minutos (Parrilla y cols. 2005). Una vez teñidas e inmediatamente antes de su paso por el citómetro de flujo, las muestras se filtraron a través de un filtro con una malla de nylon de 30 µm, y se les añadió 1 µL de una solución de colorante alimentario FD&C Red #40 con el fin de identificar los espermatozoides no viables de la muestra. Los espermatozoides se separaron usando la tecnología Beltsville para separación espermática (Johnson y cols. 1989), adaptada para separación a alta velocidad. El citómetro de flujo utilizado fue un MoFlo SX (Dako Colorado, Fort Collins, Colorado, USA) equipado con un Laser UV (351–364 nm) funcionando a una potencia de salida de 175 mW. Las muestras se separaron usando una solución tamponada de fosfato (PBS) descrita por Catt y cols. (1997) (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, with 0.058 g/L penicilina G, y 0.05 g/L sulfato de estreptomina; pH 7–7.1, 285–310 mOsm) o PBS suplementado con 0.1% de EDTA (PBS-EDTA) como fluido envolvente, dependiendo de los experimentos. Los espermatozoides portadores del cromosoma X se recogieron (20 millones por tubo) en tubos de 50 mL pretratados con BSA (1 %, p:v) que contenían 2.5 mL de diferentes medios de recolección dependiendo del experimento a realizar. Los espermatozoides separados se centrifugaron ($3000 \times g$; 4 minutos) y posteriormente se diluyeron a la concentración adecuada y se conservaron en refrigeración o mediante criopreservación según el estudio a realizar.

c) Semen Criopreservado

Criopreservación estándar

Las fracciones ricas de los eyaculados se centrifugaron durante 3 min a $2400 \times g$, y una vez retirado el sobrenadante los pelets se criopreservaron siguiendo el protocolo para la congelación de

semen en pajuelas descrito por Hernández y cols. (2007). Para ello, los pelets se diluyeron en un medio básico de congelación (LEY; 80 % [v:v] β -lactosa, 20 % [v:v] yema de huevo, y 100 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de Kanamicina, con un pH 7.2 y 312 ± 6 mOsm/kg) hasta una concentración de 1.5×10^9 espermatozoides/mL, se enfriaron hasta 5 °C a una velocidad de 0.08 °C/min y, una vez alcanzada esta temperatura, se diluyeron de nuevo con el segundo diluyente de congelación (LEYGO; 89.5 % LEY, 1.5 % Equex STM [Nova Chemical Sales, Scituate, Ma, USA], y 9 % de glicerol [v:v], con un pH de 6.2 y 1.715 ± 15 mOsmol/kg) hasta una concentración final de 1×10^9 espermatozoides por mL. El semen diluido y enfriado se envasó en pajuelas francesas de PVC de 0.5 mL (Minitube, Tiefenbach, Alemania) y se congeló usando un congelador programable. Las pajuelas permanecieron en un tanque de nitrógeno líquido durante al menos 2 semanas antes de ser descongeladas. Las muestras se descongelaron por inmersión durante 20 segundos en un baño de agua recirculante a una temperatura de 37 °C. Una vez descongeladas, las muestras se diluyeron con BTS (1:1, v:v) y se incubaron en la oscuridad a 37 °C durante diferentes tiempos antes de su evaluación dependiendo del experimento.

Criopreservación de los espermatozoides separados

Para la criopreservación de los espermatozoides separados, el pelet se diluyó en LEY a una concentración de 30×10^6 espermatozoides/mL, se enfriaron en dos horas hasta 5 °C y seguidamente se diluyeron con LEYGO hasta 20×10^6 espermatozoides/mL. Las muestras se envasaron en pajuelas de 0.25 mL de PVC y se congelaron en vapores de nitrógeno líquido. Las pajuelas se almacenaron en nitrógeno líquido y se descongelaron como ha sido descrito anteriormente para el semen congelado estándar. Para la descongelación, las muestras de espermatozoides criopreservados se descongelaron por inmersión durante 15 segundos en un baño de agua recirculante a una temperatura de 37 °C, después se diluyeron e incubaron, como ha sido descrito para el semen criopreservado estándar.

5. Análisis de los parámetros espermáticos

a) Motilidad espermática

La motilidad espermática se evaluó objetivamente usando un sistema computerizado de análisis espermático (ISAS ®; Proiser R+D, Paterna, España), siguiendo el procedimiento descrito por Cremades y cols. (2005). Antes de la medición de la motilidad espermática, los espermatozoides se rediluyeron cuidadosamente con BTS hasta $15\text{--}20 \times 10^6$ espermatozoides/mL y se calentaron durante 5 minutos a 37 °C. Alícuotas de 4 μL de cada uno de los grupos experimentales se depositaron en una cámara de conteo Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) precalentada a 38 °C y

transfiriéndose inmediatamente a la placa precalentada (38 °C) de un microscopio de luz equipado con una óptica de contraste de fases. Se analizaron un total de 6–9 campos, evaluando un mínimo de 400 espermatozoides por muestra. Antes del análisis de los campos, se identificaron las trayectorias de cada uno de los espermatozoide presentes en cada campo, con el objetivo de excluir las posibles partículas y disminuir el riesgo de que falsos espermatozoides fueran incluidos en el análisis. Se midieron los siguientes parámetros: la motilidad total (porcentaje de espermatozoides con una media de velocidad mayor a 20 $\mu\text{m/s}$) y la motilidad progresiva (porcentaje de espermatozoides con una velocidad lineal mayor a 40 $\mu\text{m/s}$, linealidad mayor al 50 % y una rectitud mayor al 75 %) (Schimidt y Kamp, 2004).

b) Viabilidad espermática

La viabilidad espermática fue evaluada por medición simultánea de la integridad de la membrana plasmática y de la integridad acrosomal usando el procedimiento de triple tinción descrito por Martínez-Alborcia y cols. (2012). Alícuotas conteniendo 2×10^6 espermatozoides se transfirieron a tubos que contenían 2 μL de H-42 (0.05 mg/mL en PBS), 2 μL una solución de Yoduro de Propidio (PI, 0.5 mg/mL stock solution in PBS) y 2 μL de fluoresceína conjugada con aglutinina de cacahuete (PNA-FITC, 200 $\mu\text{g/mL}$ de la solución existente en PBS). Las muestras se agitaron suavemente y se incubaron en la oscuridad a 37 °C durante 10 minutos. Inmediatamente antes de análisis, se añadieron 400 μL de PBS en cada uno de los tubos. El análisis se realizo a temperatura ambiente, usando un citómetro de flujo BD FACSCanto II (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA) equipado con tres láseres: Azul (488 nm, refrigerado por aire, 20 mW solid state), rojo (633 nm, 17 mW HeNe), y violeta (405 nm, 30 mW solid state). Los datos fueron adquiridos usando el software BD FACSDiva (Becton Dickinson & Company). Las partículas que no eran espermatozoides se eliminaron del análisis basándonos en la fluorescencia de H-42 (contenido de ADN) y la adquisición de datos concluyó cuando se alcanzaron los 10000 eventos positivos al H-42. El espectro de fluorescencia del H-42 se detectó con un filtro de paso de banda de 450/50 nm, mientras los espectros de fluorescencia del PI y PNA-FITC se detectaron utilizando un filtro de longitud de onda larga de 670 nm y un filtro de paso de banda de 530/30, respectivamente. Los espermatozoides analizados se clasificaron en 4 poblaciones: (1) membrana plasmática y acrosoma intactos (PI-/FITC-PNA-), (2) membrana plasmática intacta y acrosoma dañado/reaccionado (PI-/FITC-PNA+), (3) membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (PI+/FITC-PNA-), y (4) membrana plasmática y acrosoma dañados (PI+/FITC-PNA+). Solo los espermatozoides viables (aquellos que tenían la membrana plasmática y los acrosomas intactos (PI-/FITC-PNA-)) y aquellos espermatozoides que tenían el acrosoma dañado/reaccionado (FITC-PNA+) fueron incluidos en el análisis estadístico.

c) Integridad del ADN espermático

El test de la dispersión de la cromatina espermática (SDC) se utilizó para determinar el índice de fragmentación del ADN (DFI) en espermatozoides de verraco. Para este propósito, las muestras se procesaron usando el kit comercial Sperm-Sus-Halomax[®] para microscopio de fluorescencia (Halotech DNA SL., Madrid, España), siguiendo el protocolo incluido con el kit. Un volumen de 25 μL de la muestra espermática con un total de 500000 espermatozoides se añadió al vial que contenía la agarosa licuada y se mezcló exhaustivamente usando un vortex. En un porta pre-tratado para la agarosa, se depositó una gota de la mezcla de espermatozoides que se cubrió con un cubreobjetos y se depositó en una placa a 4 °C durante 5 minutos. Pasado este tiempo, el cubreobjetos se retiró cuidadosamente, y el portaobjetos se colocó horizontalmente en un recipiente con 10 mL de solución de lisis a temperatura ambiente. Tras 5 minutos, los portas se lavaron con agua destilada, se deshidrataron en baños de etanol secuenciales de 70 %, 90 % y 100 % durante 2 minutos en cada uno, se dejaron secar al aire y se conservaron en la oscuridad hasta la tinción para el análisis. Finalmente, inmediatamente antes del análisis por microscopía de fluorescencia las células se tiñeron (5–10 minutos a 37 °C en la oscuridad) usando 5 μL de una solución de 0.01 mM de PI. Un mínimo de 500 espermatozoides por porta se examinaron en campos aleatorios y se clasificaron como espermatozoides con ADN fragmentado (células con un halo grande e irregular alrededor de la cabeza) o espermatozoides sin ADN fragmentado (espermatozoides que no presentaban halo alrededor de la cabeza) siguiendo las instrucciones del kit.

d) Peroxidación lipídica de la membrana plasmática

La peroxidación lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide (LPO) se evaluó mediante medición indirecta de la generación de MDA (Malondialdehído) usando el Kit BIOXYTECH MDA-586 (OxisResearch, Burlingame, CA, USA). Las muestras de semen se diluyeron con BTS y un total de 3×10^6 espermatozoides, en un volumen variable dependiendo de la muestra, y se incubó durante 30 minutos a 37 °C en presencia de 1 μL de solución de Fe^{2+} /ascorbato (11 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 40 mg de ascorbato sódico en 10 mL de agua destilada) para promover la cascada de peroxidación lipídica y la liberación de MDA. Tras la incubación, 50 μL de la muestra se mezclaron con 2 μL de Probuco, 160 μL de 1-metil-2-fenilindol (diluido en acetronitrilo/metanol [3:1, v:v]) y 37.5 μL de 12 N de HCl, para ser incubada nuevamente a 47 °C durante 60 minutos, y finalmente se centrifugó a $10000 \times g$ durante 10 minutos para la precipitación del pellet. Una alícuota de 200 μL de sobrenadante se transfirió a una placa transparente de 96 pocillos para realizar la lectura. La curva de calibración se preparó con una solución de MDA (1,1,2,2-tetrametoxipropano) que se incluyó en la misma placa, y la absorbancia se leyó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 586 nm. El índice de

peroxidación lipídica se calculo como los micromoles de MDA por cada 30×10^6 espermatozoides. La medición se realizo por triplicado en cada muestra.

e) Capacidad fecundante In Vitro

Medios de cultivo

El medio usado para recoger y lavar los complejos cúmulos-ovocitos (COCs) fue solución salina fosfatada de Dulbecco (DPBS), compuesta por 136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 y 1.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, suplementada con 4 mg/mL BSA, 0.34 mM piruvato sódico, 5.4 mM D-glucosa y 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamicina (mDPBS). El medio de maduración de los ovocitos fue North Carolina State University (NCSU-23; Petters y Wells, 1993) libre de BSA, suplementado con 10% (v:v) de fluido folicular porcino (FF), 0.8 mM cisteína, 10 ng/mL factor de crecimiento epidérmico y 5 nM 9-cis ácido retinoico. El medio básico utilizado para la fecundación in vitro fue esencialmente el mismo que el descrito por Abeeydera y Day (1997). Este medio, consistio en una solución tamponada de Tris modificada (mTBM), compuesta por 113.1 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 7.5 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Tris, 11 mM de Glucosa y 5 mM de piruvato sódico, suplementado con 2 mM de cafeína y 0.2 % de BSA. El medio de cultivo de embriones fue un medio basado en NCSU-23 suplementado con 0.4 % BSA y pre-equilibrado antes de su utilización.

Maduración In Vitro

Los ovarios se obtuvieron de cerdas prepuberes sacrificadas en un matadero industrial y se transportaron hasta el laboratorio a 35 °C en una solución salina (0.9 % NaCl) suplementada con 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron tres veces en una solución salina, y se aspiró el contenido de los folículos que medían entre 3–6 mm de diámetro usando una aguja de 18-ga conectada a una jeringa de 10 mL. Los ovocitos con varias capas de células del cúmulus, y citoplasma uniformemente granulado, se lavaron 3 veces en el medio de maduración y se colocaron en una placa de 4-pocillos. (Nunc, Roskilde, Dinamarca) para su maduración. Cada uno de los pocillos contenía 70–80 COCs en 500 μL de medio de maduración suplementado con 10 IU/mL de gonadotrofina coriónica equina (eCG; Folligon Intervet internacional B.V., Boxmeer, Holanda) y 10

UI/mL gonadotropina coriónica humana (hCG; Veterin Corion, Divasa Farmavic, S.A., Barcelona, España), permaneciendo durante 20–22 h en dicho medio y posteriormente en un medio de maduración sin hormonas durante las siguientes 20 a 22h. La maduración se llevo a cabo bajo una capa de aceite mineral, en una atmósfera de 5 % CO₂ en aire, a 39 °C y una humedad relativa de 95–100 %. Después de la maduración, los COCs se desnudaron con 0.1 % de hialuronidasa en medio de maduración mediante vortex (2 min a 1.660 vueltas/minuto) y a continuación, los ovocitos se lavaron dos veces en medio de maduración y finalmente tres veces en medio de fecundación.

Fecundación In vitro

Grupos de 30 ovocitos desnudados se distribuyeron en gotas de 50 µL de medio de fecundación en placas Petri de 35 × 10 mm que se cubrieron con aceite mineral y se mantuvieron a 39°C en una atmosfera con un 5% CO₂ en aire durante aproximadamente 30 min hasta la adición de los espermatozoides. Las muestras de espermatozoides con las que se iba a realizar la fecundación se centrifugaron a 3000 × g durante 4 minutos. Después de retirar el sobrenadante, los pellets se re suspendieron con 1 mL de mTBM precalentado. Tras la dilución apropiada, se añadieron 50 µL de la suspension de espermatozoides a 50 µL de medio de fecundación que contenía los ovocitos. El ratio espermatozoides:ovocitos fue de 1000:1. Los gametos se co-incubaron durante 5h a 39 °C en una atmósfera de 5% CO₂ en aire.

Análisis de la maduración y penetración espermática

Para evaluar los parámetros de maduración y fecundación, los presuntos cigotos se montaron en portas y se fijaron con ácido acético:etanol (1:3) durante 48–72 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se realizo una tinción con un 1 % de lacmoid en 45 % (v:v) de ácido acético y se examinaron los portas con un microscopio de contraste de fases a 400 aumentos. Los parámetros de fecundación se evaluaron 16–18 h después de la inseminación. Los ovocitos se consideraron como penetrados cuando contenían 1 ó más cabezas espermáticas descondensadas y/o pronúcleo masculino, con sus correspondientes colas espermáticas, y dos corpusculos polares. Los ovocitos inmaduros o degenerados no se contaron. Los parámetros de fecundación evaluados fueron: (1) tasa de penetración, definido como el ratio de ovocitos penetrados del número total de ovocitos madurados, (2) tasa de polispermia, definido como el ratio de ovocitos conteniendo 2 ó más pronúcleos masculinos del total

de ovocitos penetrados y (3) número de espermatozoides por ovocito, definido como el número de espermatozoides penetrando un ovocito.

6. Inseminación laparoscópica

a) Tratamientos de sincronización y superovulación

La superovulación de las hembras se indujo inyectando a cada una con 1250 UI de eCG por vía intramuscular 24 h después del destete. A aquellas cerdas que estaban en celo a las 72 h después de la administración de eCG, se les administraron 750 IU de hCG. La detección del celo se realizó 2 veces al día (7:00–17:00), empezando 2 días después de la inyección de eCG mediante la exposición de las cerdas a la presencia de un verraco adulto y la detección de reflejo de inmovilización por parte de un operario con amplia experiencia.

b) Control del estatus ovárico mediante ecografía trans-rectal

El estatus ovárico de las cerdas se examinó 30–32 h después de la salida a celo mediante ecografía trans-rectal siguiendo el protocolo previamente descrito por Bolarín y cols. (2009). Se observaron ambos ovarios simultáneamente para identificar estructuras funcionales como folículos preovulatorios (diámetro > 6 mm), cuerpos hemorrágicos o cuerpos lúteos. El tamaño de los folículos se midió utilizando las funciones de medición del software del ecógrafo utilizado.

Los ovarios se examinaron 2–3 h antes de la LI para observar el estatus ovárico y sólo las cerdas en estadio preovulatorio se incluyeron en el estudio. El estatus ovárico se observó nuevamente 16–18 h después de la realización de las inseminaciones laparoscópicas con el objetivo de comprobar que las cerdas habían ovulado en un tiempo apropiado.

c) Inseminación

Las inseminaciones laparoscópicas (LI) se realizaron bajo condiciones de campo siguiendo el protocolo descrito por García y cols. (2007). Las cerdas se sedaron mediante la administración de azaperona (2 mg/kg de peso corporal, vía intramuscular). La anestesia general se indujo con tiopental sódico (7 mg/kg de peso, vía intravenosa) y se mantuvo mediante inhalación de isofluorano (3.5–5 %). Las cerdas se colocaron en la posición de Trendelenburg en un ángulo de 20 % sobre la horizontal. Se realizó una incisión de 1.5 cm cerca del ombligo. Los bordes de la incisión se sujetaron con pinzas y

se insertó un trocar Optiview de 12-mm con un laparoscopio de 0°. Tras el acceso a la cavidad abdominal y el comienzo del neumoperitoneo, se procedió a quitar el trocar Optiview y se dejó el laparoscopio de 0°. Se insufló CO₂ en la cavidad abdominal hasta alcanzar una presión de 14 mmHg. A cada uno de los lados del hemiabdomen se colocaron dos puertos accesorios, los cuales proporcionaron el acceso laparoscópico de dos fórceps Duval para la manipulación del tracto genital. La inyección de los espermatozoides se realizó utilizando una aguja Chiba. El oviducto se sujetó en el área del infundíbulo, cerca de la ampolla, para inyectar la dosis espermática en la región ampular en dirección al istmo. Antes de ser insertada a través del puerto accesorio, la aguja Chiba se cubrió con una funda de plástico duro. El cuerno uterino se sujetó a 2 cm distalmente respecto a la unión utero-tubárica (UTJ) y la dosis espermática fue inyectada a 0.8–1 cm de la UTJ en dirección al istmo. El procedimiento se repitió en el lado contralateral. Para la LI simple, los espermatozoides se depositaron únicamente en cada ampolla oviductal, mientras que para la doble LI, el semen se depositó en las ampollas oviductales y en el cuerno uterino cerca de las UTJ. Después del procedimiento de inseminación, se retiraron los trocates y se realizó una sutura menor.

d) Evaluación de los parámetros reproductivos

Desde el día 18 hasta los siguientes 38 días después de la LI las cerdas se expusieron una vez al día al contacto con los machos para identificar a las cerdas no gestantes. Las gestaciones se determinaron mediante ecografía transabdominal 24 días después de la LI. Aquellas cerdas que inicialmente se diagnosticaron como gestantes pero que posteriormente mostraron una salida a celo retrasada (mayor a 24 días) se consideraron cerdas que habían perdido los embriones en un estadio temprano de la gestación. Las cerdas gestantes se monitorizaron hasta que la gestación llegó a término y se registraron los siguientes datos: tasas de parto, tamaño de camada, lechones vivos al nacimiento, sexo de los lechones y peso al nacimiento.

6. Análisis estadístico.

La edición de los datos y los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 (SPSS para Windows, 2002, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$. Los datos de todos los replicados se analizaron mediante un procedimiento ANOVA Mixto (Artículos 1, 2, 3). Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores se compararon usando un test post hoc Bonferroni. En el artículo 4, los porcentajes de cerdas que retornaban al estro, las tasas de gestación y de llegada a parto y el porcentaje de animales de sexo deseado nacidos se analizaron usando el Test exacto de Fisher. El tamaño de

camada, el número de lechones nacidos vivos y el peso al nacimiento se compararon utilizando un ANOVA o T-test de student. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores se compararon usando el test Tukey.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Objetivo 1: Evaluar la capacidad de los espermatozoides procedentes de eyaculados de diferentes verracos para resistir el procedimiento de separación espermática por citometría de flujo (artículo 1).

Dieciocho fracciones ricas procedentes de 6 verracos (3 por verraco) se diluyeron en BTS y se dividieron en 3 alícuotas. Las alícuotas fueron (1) diluidas hasta 3×10^7 espermatozoides/mL y conservadas a 17 °C durante 72 h, (2) congeladas-descongeladas siguiendo el procedimiento estándar en pajuelas de 0.5 mL, y (3) separadas mediante citometría de flujo y o bien, conservadas en refrigeración a 17 °C durante 6 horas, o bien criopreservadas (2×10^7 espermatozoides/mL usando un protocolo de criopreservación estándar para pajuelas de 0.25 mL). La motilidad y viabilidad espermática, la peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN se evaluaron tras 72 horas de almacenaje y 30 minutos después de la descongelación para las muestras refrigeradas y descongeladas, respectivamente. Las muestras sometidas al proceso de separación por citometría de flujo se evaluaron en diferentes etapas del proceso, concretamente: tras el proceso de tinción (semen teñido con H-42), inmediatamente después de la separación y después de 6 horas de conservación a 17 °C (espermatozoides separados refrigerados) y 30 minutos después de la descongelación (espermatozoides criopreservados).

Todas las muestras de semen fresco mostraron una calidad satisfactoria a su llegada al laboratorio y no se observaron diferencias entre machos. El porcentaje total de espermatozoides móviles y viables fue superior al 80 % en todos los casos, y el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado fue inferior al 4 % en todas las muestras. En general, ninguna muestra de semen fresco generó más de 20 μmol de MDA por cada 30×10^6 de espermatozoides. Todas las técnicas de procesamiento usadas afectaron a la calidad espermática ($P < 0.01$), independientemente del verraco usado, dando lugar a una reducción de los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática y a un incremento de la generación de MDA y de los porcentajes de fragmentación de ADN. Las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre verracos (efecto de los verracos dentro de cada técnica de procesamiento

de semen) e intra-verraco (efecto de la técnica de procesado dentro de cada verraco) fueron evidentes para todos los parámetros de calidad de espermática evaluados, indicando variabilidad individual en la capacidad de los espermatozoides de diferentes verracos para resistir las distintas técnicas de procesamiento de semen utilizadas.

Objetivo 2: Optimizar los protocolos para la criopreservación de los espermatozoides de verraco separados mediante citometría de flujo (Artículo 2).

Experimento 1

En este experimento, evaluamos la efectividad del protocolo de criopreservación estándar para la congelación de espermatozoides separados a concentraciones bajas. El semen utilizado en este estudio se obtuvo de 3 verracos (dos replicados por verraco). Las fracciones ricas de los eyaculados se dividieron en dos alícuotas, y mientras una de ellas se procesó para la separación espermática por citometría de flujo y posterior congelación a bajas concentraciones (20×10^6 espermatozoides/mL; grupo S20), la otra alícuota se usó para preparar los grupos control. Esta última alícuota se almacenó en las mismas condiciones que las muestras usadas para la separación espermática. Uno de los grupos control incluyó espermatozoides no-separados sometidos a las mismas condiciones de las muestras separadas (baja concentración espermática; Grupo C20) y el otro espermatozoides congelados siguiendo el protocolo de congelación estándar para espermatozoides de porcino que ha sido descrito anteriormente (alta concentración espermática de 1000×10^6 espermatozoides/mL; Grupo C1000). En ambos experimentos, la motilidad total, motilidad progresiva y la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma se evaluaron a 5 °C antes de la congelación y después de 30, 90 y 150 minutos de incubación post-descongelación (37°C). La integridad del ADN se analizó antes de la congelación y después de un periodo de incubación de 150 minutos (37°C) post-descongelación.

Los resultados de este experimento indicaron que la congelación a bajas concentraciones de espermatozoides induce una disminución ($P < 0.05$) de la motilidad total y progresiva a los 90 y 150 minutos tras la descongelación independientemente de si los espermatozoides fueron separados o no. Sin embargo, la integridad de la membrana espermática no se vio afectada en ninguno de los tiempos de evaluación analizados. Las muestras congeladas a 1000×10^6 espermatozoides/mL mostraron porcentajes más altos de fragmentación del ADN que las muestras congeladas a menor concentración independientemente de si eran separadas o no separadas. A pesar de estas diferencias, todos los grupos evaluados en este estudio tuvieron un índice de fragmentación del ADN muy bajo ($< 2.5\%$), lo cual indicó una limitada significancia biológica de los resultados.

Experimento 2

Este experimento se realizó con el fin de evaluar los efectos de las diferentes concentraciones de glicerol sobre la funcionalidad de las muestras de espermatozoides separados y no separados congelados a bajas concentraciones (20×10^6 espermatozoides/mL). Los 3 verracos de este experimento fueron los mismos utilizados en el experimento 1, y se realizaron 2 replicados por verraco. Las fracciones ricas de los eyaculados se dividieron en 2 alícuotas. Una se sometió al proceso de separación espermática (Grupos S20), y la otra alícuota se usó para la preparación de las muestras control (Grupos C20). Después del proceso de separación espermática o de alta dilución (en el caso del grupo control), las muestras se centrifugaron, y los pellets re-diluyeron y se refrigeraron hasta 5 °C utilizando diluyente LEY como ha sido descrito anteriormente. Una vez alcanzados los 5°C las muestras fueron diluidas con un volumen igual de LEYGO hasta alcanzar una concentración final de glicerol de 1.6%, 0.5%, 1%, 2% y 3%, respectivamente. Las características espermáticas se evaluaron en los mismos tiempos que en el experimento 1. Se observaron efectos significativos sobre la motilidad total y progresiva debido al aumento de las concentraciones de glicerol en los grupos S20 y C20 solamente a los 90 y 150 minutos después de la descongelación. Las muestras congeladas con un 3% de glicerol mostraron menores ($P < 0,05$) valores de motilidad en comparación con aquellas congeladas en presencia de un 0,5% y un 1% de glicerol. El porcentaje de espermatozoides viables no se vio afectado por el tipo de espermatozoides (separados o control) ni por la concentración de glicerol utilizada, cuando las muestras se evaluaron después de 30 y 90 minutos de incubación post-descongelación. Al igual que en el experimento 1, las muestras control mostraron mayores porcentajes de espermatozoides con ADN dañado que los espermatozoides separados, aunque los valores de fragmentación de ADN encontrados fueron inferiores a un 2,5%.

Objetivo 3: Diseñar un protocolo adecuado para la manipulación espermática durante y después del proceso de separación con el fin de obtener espermatozoides separados con una óptima capacidad fecundante (Artículo 3).

Experimento 1

En este experimento se evaluó la calidad (motilidad y viabilidad) y fertilidad in vitro de muestras de espermatozoides altamente diluidos, imitando la alta dilución a la que se someten los espermatozoides durante el procedimiento de separación. Para ello espermatozoides no separados fueron altamente diluidos en PBS (Grupo HD-PBS) o BTS (Grupo HD-BTS), a una concentración de 1×10^6 espermatozoides/mL. La alta dilución fue realizada gradualmente en un tiempo aproximado de

60 minutos a una temperatura de 21–22 °C. Muestras de espermatozoides procedentes de los mismos verracos se diluyeron a una concentración de 100×10^6 espermatozoides/mL en BTS y se usaron como grupo control. Todas las muestras se incubaron durante 10–15 minutos a 21–22 °C antes de ser evaluadas. No se encontraron diferencias entre los grupos en ningún de los parámetros de calidad espermática evaluados, independientemente del grado de dilución y del diluyente utilizado. Respecto a la fertilidad in vitro, se obtuvieron valores altos en los parámetros de fertilidad in vitro en todos los grupos y no hubo diferencias entre ellos.

Experimento 2

En este experimento analizamos los efectos de diferentes tipos de medios de recogida sobre la calidad (motilidad y viabilidad) y capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides separados. Los espermatozoides se separaron usando PBS como fluido envolvente y 3 tipos de medios de recogida diferentes: PBS, TES-Tris-Glucosa (TTG) o TTG suplementado con un 2% de yema de huevo (TTG-EY). Como grupo control se utilizaron espermatozoides no separados diluidos con PBS hasta una concentración de 1×10^6 espermatozoides/mL en presencia de PBS, TTG o TTG-EY, respectivamente. Los resultados de este experimento mostraron que ni el proceso de separación, ni el medio de recogida influyeron sobre la calidad espermática. Además, no existieron interacciones entre el tratamiento al que se sometieron los espermatozoides (separación o alta dilución) y el medio de recogida utilizado sobre los parámetros de calidad de los espermatozoides. Sin embargo, hubo un claro efecto del tratamiento sobre los parámetros de fertilidad in vitro evaluados. La tasa de penetración y de polispermia, así como el número de espermatozoides por ovocito de las muestras separadas fue menor ($P < 0.001$) en comparación con las muestras control. Mientras que el medio de recogida no afectó a los parámetros de fertilidad de los espermatozoides control, cuando los espermatozoides separados fueron recogidos en TTG-EY se obtuvieron tasas más altas de penetración en comparación con los recogidos en PBS o TTG ($P < 0.05$), aunque estas tasas fueron inferiores al 26%.

Experimento 3

Este experimento se analizaron los efectos de la composición del fluido envolvente, así como de la combinación más apropiada de este fluido y del medio de recogida sobre la calidad (motilidad y viabilidad) y funcionalidad (capacidad fecundante in vitro) de los espermatozoides separados. Los espermatozoides se separaron usando dos tipos de fluido de envolvente (PBS y PBS-EDTA) y 3 tipos diferentes de medios de recogida (PBS o PBS-EDTA, TTG y TTG-EY). Los grupos control, fueron preparados con espermatozoides no separados diluidos en PBS o PBS-EDTA hasta una concentración de 1×10^6 espermatozoides/mL. Los resultados demostraron en primer lugar, que en los

espermatozoides separados ni la composición del fluido envolvente ni el medio de recogida utilizado influyeron sobre la calidad espermática. En segundo lugar, los resultados no demostraron diferencias significativas entre espermatozoides control y separados, respecto a estos parámetros de calidad espermática independientemente del fluido envolvente y del medio de recogida empleado. Respecto al análisis de la capacidad fecundante in vitro, las tasas más bajas de penetración, polispermia y número de espermatozoides por ovocito ($P < 0.05$) se obtuvieron en los espermatozoides separados utilizando PBS como fluido envolvente. Cuando los espermatozoides se separaron utilizando PBS-EDTA como fluido envolvente se observó un efecto del medio de recogida y una mejora ($P < 0.001$) en todos los parámetros de fertilidad utilizando TTG-EY como medio de recogida. En ambos grupos control se obtuvieron unas tasas altas de penetración ($> 97.0\%$), polispermia ($> 95.0\%$) y número de espermatozoides por ovocito ($> 6.5\%$). Estos resultados fueron superiores ($P < 0.001$) a aquellos obtenidos en todos los grupos de espermatozoides separados, excepto aquellos que se separaron empleando PBS-EDTA como fluido envolvente y TTG-EY como medio de recogida, que mostraron tasas de penetración similares a las de los grupos control (93.7 ± 1.8).

Objetivo 4: Desarrollar un procedimiento útil de inseminación laparoscópica con un número muy bajo de espermatozoides separados por citometría de flujo que permita obtener unos resultados de fertilidad óptimos a nivel de granja (Artículo 4).

Experimento 1

En este experimento se evaluaron los efectos de la inseminación laparoscópica simple (solo en los oviductos) y doble (en los oviductos y en los extremos del cuerno uterino) con espermatozoides X separados por citometría de flujo, sobre los parámetros reproductivos en cerdas. Las cerdas a utilizar ($n = 109$) se distribuyeron al azar en tres grupos y se inseminaron por vía laparoscópica (IL) usando uno de los siguientes protocolos: (1) LI simple con 1×10^6 de espermatozoides no separados (0.5×10^6 espermatozoides por oviducto), (2) LI simple con 1×10^6 espermatozoides separados (0.5×10^6 espermatozoides en cada oviducto) o (3) LI doble con 2×10^6 espermatozoides separados (0.5×10^6 espermatozoides en cada oviducto y 0.5×10^6 espermatozoides en cada cuerno uterino).

El análisis de los resultados obtenidos demostró que no existían diferencias en el porcentaje de cerdas gestantes entre aquellas inseminadas con espermatozoides separados o control. Sin embargo, y a pesar de que las diferencias no alcanzaron niveles significativos, este porcentaje tendió a ser mejor en las cerdas inseminadas con espermatozoides no separados. Las tasas de parto fueron menores ($P < 0.05$) en cerdas inseminadas con espermatozoides separados. Al comparar los resultados de las LI realizadas con espermatozoides separados, las tasas de parto tendieron a ser más altas en el grupo de cerdas inseminadas usando una doble LI ($P = 0.09$). En los grupos de cerdas inseminadas con espermatozoides no separados y cerdas inseminadas utilizando una doble LI con espermatozoides separados, el porcentaje de hembras diagnosticadas como gestantes que llegaron a parto fue de 100 % y el 86.7 % ($P = 0.13$) respectivamente; por el contrario, las cerdas inseminadas con LI simple y con espermatozoides separados tuvieron una mayor pérdida de gestación y una tasa mayor de retornos irregulares (38.7 %; $P < 0.04$). Respecto al resto de parámetros evaluados (tamaño de camada, número de lechones nacidos vivos y peso al nacimiento de los lechones) no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales. El ratio de animales de sexo deseado obtenido fue de 8.8 hembras nacidas por cada 10 machos para las cerdas inseminadas con semen no separado y de 122.7 hembras por cada 10 machos para las cerdas inseminadas con espermatozoides separados.

Experimento 2

En este experimento, evaluamos los efectos del número de espermatozoides separados utilizados sobre los parámetros reproductivos de cerdas inseminadas usando una doble LI. En este caso las cerdas ($n = 109$) se distribuyeron al azar en dos grupos experimentales y se inseminaron con doble LI usando una de las siguientes dosis de inseminación: (1) 3×10^6 espermatozoides separados por cerda (0.5×10^6 espermatozoides en cada oviducto y 1×10^6 espermatozoides en cada cuerno uterino) o (2): 6×10^6 espermatozoides separados por cerda (1×10^6 espermatozoides en cada oviducto y 2×10^6 espermatozoides en cada cuerno uterino). Los resultados demostraron que utilizando este procedimiento de inseminación es posible la obtención de altas tasas de gestación (90%) y parto (80%) independientemente del número de espermatozoides separados utilizado. Las cerdas inseminadas con mayor número de espermatozoides presentaron una tendencia ($P = 0.09$) a tener un mayor número de lechones por camada que aquellas inseminadas con menos espermatozoides. El peso de los lechones al nacimiento fue más bajo ($P < 0.05$) cuando se utilizó un mayor número de espermatozoides en las inseminaciones. El ratio de animales de sexo deseado obtenido fue de 115 hembras por cada 10 machos y no hubo diferencias entre grupos respecto a este parámetro.

CONCLUSIONES

1.- Existe una variabilidad individual entre verracos respecto a su capacidad para resistir el proceso de separación espermática por citometría de flujo. Además la respuesta de los espermatozoides de un verraco a una determinada biotecnología espermática no predice la respuesta de los mismos a otros procedimientos.

2.- La congelación de espermatozoides a bajas concentraciones en combinación con el uso de concentraciones finales de glicerol de 0.5–1% podría ser un método apropiado para la criopreservación de espermatozoides de verraco separados por citometría de flujo.

3.- La adición de EDTA en el fluido envolvente y de yema de huevo en el medio de recogida mejora la capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides de verraco separados y ambos agentes deberían ser incluidos como componentes esenciales en los medios utilizados en los procedimientos de separación espermática por citometría de flujo en porcino.

4.- El procedimiento de inseminación laparoscópica descrito en el presente estudio es un método efectivo y aplicable en condiciones de granja para la obtención de descendencia de sexo deseado en ganado porcino. El protocolo de doble inseminación laparoscópica, usando entre 3 y 6 millones de espermatozoides separados por cerda permite obtener unos adecuados parámetros reproductivos a nivel de granja, haciendo que la tecnología de separación espermática por citometría de flujo sea potencialmente aplicable en núcleos de selección genética en ganado porcino.

ABBREVIATIONS

ABREVIATURAS

AI: Artificial Insemination

BP: Band Pass

BSA: Bovine Serum albumin

BTS: Beltsville Thawing solution

COCs: Cumulus Oocytes complexes

DFI: DNA fragmentation index

DUI: Deep Intrauterine insemination

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline medium

eCG: Equine chorionic gonadotropin

FT: Frozen-Thawed

EY: Egg Yolk

H-42: Hoechst 33342

hCG: Human chorionic gonadotrophin

LEY: β -Lactose – Egg yolk

LEYGO: β -Lactose – Egg yolk – Glycerol – Equex

LI: Laparoscopic Insemination

LP: Long Pass

LPO: Lipid peroxidation

MDA: Malondialdehyde

mDPBS: Modified Dulbecco's phosphate-buffered saline medium

MII: Metaphase II

mTBM: Modified Tris-buffered medium

NCSU23: North Caroline State University medium

PBS: Phosphate-buffered saline medium

PI: Propidium Iodide

PNA-FITC: Fluorescein-labelled peanut agglutinin

ROS: Reactive Oxygen species

SDC: Sperm chromatin dispersion

SREFs: Sperm-rich ejaculate fractions

TBM: Tris-buffered medium

TL-HEPES PVA: Tyrode's lactate – Hepes PVA

TTG: TES – Tris – Glucose

UTJ: Utero-Tubal Junction

UV: Ultraviolet

ZP: Zona pellucida

REFERENCES

REFERENCIAS

- Abeydeera L.R., Day B.N. (1997). Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* **57**, 729-734.
- Alm K, Peltoniemi OAT, Koskinen E, Andersson M. (2006). Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reprod Domest Anim.* **41**, 210–213.
- Bathgate R, Grossfeld R, Susetio D, Ruckholdt M, Heasman, Rath D, et al. (2008). Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm. *Anim Reprod Sci.* **104**, 440–444.
- Bathgate R. (2008) Functional integrity of sex-sorted, frozen-thawed boar sperm and its potential for artificial insemination. *Theriogenology.* **70**, 1234–1241.
- Beilby KH, de Graaf SP, Grupen CG. (2010). The effect of sperm and cryoprotectant concentration on the freezing success of sex sorted ram sperm for in vitro fertilization. *Theriogenology* **74**, 786–794.
- Boe-Hansen GB, Morris ID, Ersbøll AK, Greve T, Christensen P. (2005). DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology* **63**, 1789–1802.
- Bolarin A, Vazquez JM, Parrilla I, Vazquez JL, Martinez EA, et al. (2009). Validation of trans-rectal ultrasonography for counting preovulatory follicles in weaned sows. *Anim Reprod Sci* **113**, 137–142.
- Caballero I, Vazquez JM, Mayor GM, Almiñana C, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martinez EA. (2008). PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *Int J Androl* **32**, 505–513.
- Catt SL, O'Brien JK, Maxwell WMC, Evans G (1997). Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* **32**, 251–8.
- Cremades T, Roca J, Rodriguez-Martinez H, Abaigar T, Vazquez JM, Martinez EA. (2005). Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *J Androl* **26**, 610–618.
- Evans G, Maxwell WMC. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney.
- Fantinati P, Zannoni A, Bernardini C, Webster N, Lavitrano M, Forni M, Seren E, Bacci ML. (2005). Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application. *Theriogenology* **63**, 806–817.

Garcia EM, Vazquez JM, Parrilla I, Calvete JJ, Sanz L, Caballero I, et al. (2007). Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* **68**, 771–778.

Grossfeld R, Klinc P, Sieg B, Rath D. (2005). Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology* **63**, 2269–2277.

Hernandez M, Roca J, Gil MA, Vazquez JM, Martinez EA. (2007). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* **67**, 1436–1445.

Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. (1989). Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* **41**, 199–203.

Johnson LA. (1991). Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reprod Dom Anim* **26**, 309–14.

Johnson LA, Welch GR. (1999). Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X- and Y-sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* **52**, 1323–1341.

Klinc P, Rath D. (2007). Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reprod Domest Anim* **42**, 63–7.

Klinc P, Frese D, Osmers H, Rath D. (2007). Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. *Reprod Domest anim* **42**, 58–62.

Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I et al. (2002). Minimal number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction* **123**, 163–70.

Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, et al. (2005). An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production. *Reprod Domest Anim* **40**, 300–9.

Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. (2012). Detrimental Effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS ONE* **7** (5): e36550. doi: 10.1371/journal.pone.0036550

Maxwell WMC, Johnson LA. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* **46**, 408–418

Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA. (1997). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil*

Dev **8**,1165–1178.

Maxwell WMC, Johnson LA. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* **52**, 1353–1362.

Parrilla I, Vazquez JM, Gil MA, Caballero I, Almiñana C, Roca J, et al. (2005). Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* **64**, 86–98.

Rath D, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR, Niemann H. (1997). Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology* **47**,795–800.

Rath D, Ruiz S, Sieg B. (2003). Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Vet Rec* **29**, 400–401.

Rath D, Johnson LA. (2008). Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod Domest Anim* **43**, 338–346.

Reicks DL, Levis DG. (2008). Fertility of semen used in commercial production and the impact of sperm numbers and bacterial counts. *Theriogenology* **70**, 1377– 1379.

Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Cuelo C, Parrilla I, Martinez EA. (2006). Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Domest Anim* **41**, 43-53.

Sharpe JC, Evans KM. (2009). Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* **71**, 4-10

Schmidt H, Kamp G. (2004). Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* **128**, 171–179.

Spinaci M, Vallorani C, Bucci D, Bernardini C, Tamanini C, Seren E, Galeati G. (2010). Effect of liquid storage on sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* **74**, 741-748.

Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Vazquez JL. (2003). Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* **59**, 1509–614.

Vazquez JM, Parrilla I, Gil MA, Cuello C, Caballero I, Vazquez JL, et al. (2008). Improving the efficiency of insemination with sex-sorted spermatozoa. *Reprod domest Anim* **43**, 1–8.

Vazquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, Martinez EA. (2009). Sex sorting

sperm by flow cytometry in pigs: Issues and perspectives. *Theriogenology* **71**, 80–88.

Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* **48**, 146–156.

ARTICLES
ARTÍCULOS

ARTÍCULO 1

Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques.

Inma Parrilla, David del Olmo, Laurien Sijses, María J. Martínez-Alborcia, Cristina Cuello, Juan M. Vázquez, Emilio A. Martínez and Jordi Roca.

Department of Medicine and Animal Surgery, Faculty of Veterinary Science, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, E-30100 Murcia, Spain

Animal Reproduction Science (2012) 132: 66-73

Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques

Revista:

Animal Reproduction Science

Resumen:

The present study aimed to evaluate the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques. Eighteen sperm-rich ejaculate samples from six boars (three per boar) were diluted in Beltsville Thawing Solution and split into three aliquots. The aliquots were (1) further diluted to 3×10^7 sperm/mL and stored as a liquid at 17 °C for 72 h, (2) frozen-thawed (FT) at 1×10^9 sperm/mL using standard 0.5-mL straw protocols, or (3) sex-sorted with subsequent liquid storage (at 17 °C for 6 h) or FT (2×10^7 sperm/mL using a standard 0.25-mL straw protocol). The sperm quality was evaluated based on total sperm motility (the CASA system), viability (plasma membrane integrity assessed using flow cytometry and the LIVE/DEAD Sperm Viability Kit), lipid peroxidation (assessed via indirect measurement of the generation of malondialdehyde (MDA) using the BIOXYTECH MDA-586 Assay Kit) and DNA fragmentation (sperm chromatin dispersion assessed using the Sperm-Sus-Halomax ® test). Data were normalized to the values assessed for the fresh (for liquid-stored and FT samples) or the sorted semen samples (for liquid stored and the FT sorted spermatozoa). All of the four sperm-processing techniques affected sperm quality ($P < 0.01$), regardless of the semen donor, with reduced percentages of motile and viable sperm and increased MDA generation and percentages of sperm with fragmented DNA. Significant ($P < 0.05$) inter-boar (effect of boars within each semen-processing technique) and intra-boar (effect of semen-processing techniques within each boar) differences were evident for all of the sperm quality parameters assessed, indicating differences in the ability of spermatozoa from individual boars to withstand the semen-processing techniques. These results are the first evidence that ejaculate spermatozoa from individual boars can respond in a boar-dependent manner to different semen-processing techniques.

Dirección url:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012001108>

ARTÍCULO 2

**The Effect of Glycerol Concentrations on the Post-thaw
In Vitro Characteristics of Cryopreserved
Sex-sorted Boar Spermatozoa**

I. Parrilla, D. del Olmo, I. Caballero, T. Tarantini, C. Cuello, M.A. Gil, J. Roca,
E.A. Martinez and J.M. Vazquez.

*Department of Medicine and Animal Surgery,
University of Murcia, Murcia, Spain*

Reprod Dom Anim 47 (2012): 968-74

The Effect of Glycerol Concentrations on the Post-thaw *In Vitro* Characteristics of Cryopreserved Sex-sorted Boar Spermatozoa

Revista:

Reproduction in Domestic Animals

Resumen:

The objective of this study was to optimize protocols for the cryopreservation of sex-sorted boar spermatozoa. In the experiment 1, we evaluated the effects of a standard boar sperm cryopreservation procedure (3% final glycerol concentration) on the *in vitro* characteristics of sex-sorted sperm frozen at low sperm concentrations (20×10^6 sperm/ml; S20 group). Non-sorted spermatozoa frozen at 1000×10^6 (C1000 group) and 20×10^6 (C20 group) sperm/ml were used as the freezing control groups. In experiment 2, the effects of different final glycerol concentrations (0.16%, 0.5%, 1.0%, 2.0% and 3.0%) on post-thaw quality of the S20 and C20 groups were evaluated. In both experiments, the samples were evaluated prior to freezing (5°C) and at 30, 90 and 150 min after thawing. Experiment 1 indicated that freezing sperm at low concentrations decreased ($p < 0.05$) the total motility (TM) and progressive motility (PM) at 90 and 150 min after thawing regardless of whether the sperm were sorted or not. However, the sperm membrane integrity was not affected at any evaluation step. In experiment 2, significant effects on the TM and PM because of increased glycerol concentrations in the S20 and C20 groups were observed only at 90 and 150 min after thawing. The samples frozen in 3% glycerol showed lower ($p < 0.05$) TM and PM values when compared to those frozen in the presence of 0.5% and 1% glycerol. In both experiments, non-sorted control samples displayed higher percentages of spermatozoa with damaged DNA than sorted spermatozoa. In conclusion, the optimization of cryopreservation conditions by decreasing the glycerol concentrations can improve post-thaw motility of sex-sorted spermatozoa frozen at low concentrations.

Dirección url:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2012.02000.x/abstract;jsessionid=70EE96422C251647C4605CA0FCCCA9BA.f01t04>

ARTÍCULO 3

**Handling of boar spermatozoa during and after
flow cytometric sex-sorting process to improve their
in vitro fertilizing ability**

D. del Olmo, I. Parrilla, M.A. Gil, C. Maside, T. Tarantini, M.A. Angel, J. Roca,
E.A. Martinez and J.M. Vazquez.

*Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine,
Regional Campus of International Excellence,
University of Murcia, Murcia, Spain*

Theriogenology 80 (4) (2013): 350-6

Handling of boar spermatozoa during and after flow cytometric sex-sorting process to improve their *in vitro* fertilizing ability

Revista:

Theriogenology

Resumen:

The objective of this study was to develop an adequate sperm handling protocol in order to obtain a sex-sorted sperm population with an optimal fertilizing ability. For this purpose, different aspects of the sorting procedure were examined. The effects of the high dilution rates (experiment 1), type of collection medium used (experiment 2), and sheath fluid composition (experiment 3) on sorted boar sperm quality and function were evaluated. Sperm quality was assessed by motility and viability tests, whereas sperm function was evaluated by an *in vitro* fertilization assay which determined the penetration and polyspermy rates as well as the mean number of sperm penetrating each oocyte. In experiment 1, the results obtained indicated that the high dilution rates did not cause a decrease either in the sperm quality parameters evaluated or the *in vitro* fertilization ability of spermatozoa. In experiment 2, although sperm quality was not affected, fertilizing ability was compromised after sorting, regardless of the collection medium that was used. In the experiment 3, all groups displayed adequate sperm quality values, but higher *in vitro* fertility parameters were obtained for spermatozoa sorted in presence of EDTA in the sheath fluid and egg yolk (EY) in the collection media when compared with those sorted in absence of these protective agents. No differences in penetration rates between unsorted highly diluted (control) and sorted sperm in the presence of EDTA and EY were observed. In conclusion, fertilizing ability was compromised in sex-sorted sperm. The addition of EDTA to sheath fluid and EY to collection medium improved boar sperm fertilizing ability, and both agents should be included as essential media components in future studies.

Dirección url:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X13001696>

ARTÍCULO 4

**Successful laparoscopic insemination with a very
low number of flow cytometrically sorted
boar sperm in field conditions**

David del Olmo, Inmaculada Parrilla, Jonatan Sanchez-Osorio, Jesus Gomis, Miguel A. Angel, Tatiana Tarantini, Maria A. Gil, Cristina Cuello, Jose L. Vazquez, Jordi Roca, Juan M. Vaquez, and Emilio A. Martinez.

*Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine,
Regional Campus of International Excellence,
University of Murcia, Murcia, Spain*

Theriogenology 87 (2014): 315-20

Successful laparoscopic insemination with a very low number of flow cytometrically sorted boar sperm in field conditions

Revista:

Theriogenology

Resumen:

The aim of this study was to develop a useful procedure for laparoscopic insemination (LI) with sex-sorted boar spermatozoa that yields adequate fertility results in farm conditions. In experiment 1, we evaluated the effects of single (oviducts) and double (oviducts and tips of the uterine horns) LI with X-sorted sperm on the reproductive performance of sows. Sows (N = 109) were inseminated once as follows: (1) single LI with 0.5×10^6 unsorted sperm per oviduct; (2) single LI with 0.5×10^6 sex-sorted sperm per oviduct; or (3) double LI with 0.5×10^6 sex-sorted sperm per oviduct and 0.5×10^6 sex-sorted sperm per uterine horn. The farrowing rates were lower ($P < 0.05$) in sows inseminated with sex-sorted sperm (43.2% and 61.9% for the single and double insemination groups, respectively) than in sows from the unsorted group (91.3%). Within the sex-sorted groups, the farrowing rate tended ($P = 0.09$) to be greater in sows inseminated using double LI. There were no differences in the litter size among groups. In experiment 2, we evaluated the effect of the number of sex-sorted sperm on the reproductive performance of sows when using double LI. Sows (N = 109) were inseminated with sex-sorted sperm once using double LI with: (1) 0.5×10^6 sperm per oviduct and 1×10^6 sperm per uterine horn; or (2) 1×10^6 sperm per oviduct and 2×10^6 sperm per uterine horn. Similarly high pregnancy (90%) and farrowing (80%) rates were achieved in both groups. The sows inseminated with the highest number of sperm tended ($P = 0.09$) to have more piglets (10.8 ± 0.7 vs. 9.2 ± 0.6). A high female proportion (number of female births divided by the total of all births ≥ 0.92) was obtained in both experiments using X-sorted sperm. Our results indicate that the double LI procedure, using between 3 and 6×10^6 sex-sorted sperm per sow produces adequate fertility at the farm level, making sperm-sexing technology potentially applicable in elite breeding units.

Dirección url:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X13003968>

