

Citometría de Flujo y Sexaje de Espermatozoides en Animales

Flow Cytometry and Sperm Sexing in Animals

Paulo Salinas^{*,**,***}

SALINAS, P. Citometría de flujo y sexaje de espermatozoides en animales. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 3(3):893-902, 2016.

RESUMEN: Actualmente, cientos de crías se han gestado a través de inseminación artificial con espermatozoides sexados en producción animal. Desde 1992 se utiliza la citometría de flujo, técnica que permite diferenciar espermatozoides X e Y según su contenido de ADN. No existe, hasta el momento, ninguna otra técnica práctica para sexar espermatozoides manteniendo la capacidad fecundante. Los objetivos de esta revisión son explicar: (1) por qué los espermatozoides que contienen el cromosoma X o Y son similares fenotípicamente, pero a la vez mantienen diferencias entre ellos, (2) los principios y procedimientos utilizados para sexar espermatozoides mediante citometría de flujo y sorting (3) la precisión, velocidad y la eficiencia de los procedimientos actuales de sexaje espermático, (4) el daño espermático ocurrido durante el sexaje espermático y consecuentemente los efectos sobre la fecundidad.

PALABRAS CLAVE: Citómetro de flujo; Espermatozoides; Sexaje; Animales.

INTRODUCCIÓN

Actualmente es posible determinar con anticipación el sexo de la descendencia en algunas especies de carácter productivo previo a la fecundación con una precisión de 85-95 % (Seidel *et al.*, 1999; Welch & Johnson, 1999; Johnson, 2000; Sharpe & Evans; 2009; Martínez-Pastor *et al.*, 2010; Muratori *et al.*, 2010; Hossail *et al.*, 2011; Garner *et al.*, 2013). Este logro, demostrado por primera vez por Johnson *et al.* (1989), es el resultado de la integración de avances tecnológicos de diversos campos de la ciencia, tales como: la determinación del cariotipo cromosómico, la inseminación artificial, el mantenimiento de la capacidad fecundante espermática *in vitro*, avances en tinción específica del ADN, citometría de flujo, informática y la clasificación de células a alta velocidad. Todos éstos han sido integrados por un grupo de científicos en diferentes centros de

investigación que incluyen al Laboratorio Nacional Lawrence Livermore, el Centro de Investigación Agrícola de Beltsville del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, la Universidad de Cambridge, la Universidad Estatal de Colorado y la Compañía XY (Johnson & Seidel, 1999 ; Garner, 2001; Hossail *et al.*, 2011).

Los espermatozoides se diferencian por el tamaño de sus cromosomas sexuales.

Perspectiva histórica: La primera identificación microscópica de los cromosomas sexuales fue realizada por Guyer (1910). Esta observación, generó la idea de que el sexo en mamíferos podría ser controlado por estructuras especializadas de la cromatina. Una variedad de técnicas, en su mayoría sin éxito, fueron utilizados en un intento de identificar cuál cromosoma

* Laboratorio de Anatomía Veterinaria, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Temuco, Chile.

** Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad La Frontera, Temuco, Chile.

*** Becario CONICYT.

sexual estaba contenido en un espermatozoide, con el objetivo último de separar estos gametos. Específicamente en humanos, la primera diferencia observada entre espermatozoides X e Y fue el diferencial en la captación de la Tinción de Quinacrina en el cromosoma sexual humano (Barlow & Vosa, 1970). La heterocromatina del cromosoma Y fluoresció con más intensidad que otros, incluyendo el cromosoma X, sin embargo, esta diferencia no se observó en cromosomas no-primates.

El sexo en mamíferos se determina cuando un espermatozoide X fecunda un ovocito para producir una hembra, o al contrario, un espermatozoide Y fecunda un ovocito para producir un macho. Como consecuencia de la forma en que los cromosomas se segregan durante la meiosis, la probabilidad de que un espermatozoide transporte cualquiera de los dos cromosomas (X o Y) es la misma. La naturaleza ha llegado a extremos para minimizar las diferencias fenotípicas (*e.g.*: tamaño, forma, propiedades de la superficie) entre espermatozoides que transportan diferentes alelos y cromosomas sexuales (Seidel, 1999; Hossail *et al.*, 2011). La equivalencia fenotípica de los espermatozoides de mamíferos, a pesar de tener importantes diferencias alélicas, está asegurada por cuatro mecanismos: (1) cromosomas sexuales heterocromáticos están incluidos en vesículas post-meiosis, (2) puentes intercitoplasmáticos entre espermatozoides y espermatocitos y espermatidas permiten el intercambio de moléculas incluyendo al ARNm, (3) existe una limitada expresión post-meiosis en la mayoría de los genes autosómicos durante las últimas etapas de la espermatogénesis, debido en parte, a la extrema condensación de la cromatina y (4) los espermatozoides están cubiertos por una capa proteica secretada por células sustentaculares, ductos y las glándulas sexuales accesorias, que hacen que la superficie de los espermatozoides se mantenga anónima respecto a las posibles diferencias alélicas de cada sexo y de la membrana celular (Seidel, 1999; Garner *et al.*, 2013).

Cariogramas. Son representaciones de los cromosomas en metafase que se utilizan comúnmente para evaluar la normalidad en números y forma de los cromosomas caracte-

rísticos de una especie en particular y para identificar alguna asociación sexual. Por ejemplo, un cariograma diploide de un bovino macho normal consiste en 58 autosomas más un cromosoma X y otro Y. La diferencia en el contenido de ADN entre espermatozoides X e Y es de un 3,8 % aproximado; las diferencias para la mayoría de los mamíferos alcanzan un rango de 3 - 4,5 %, pero en otras especies la diferencia es mucho mayor (Johnson *et al.*, 1987; Johnson, 2000).

Tinción del ADN. La fuerte unión de ciertos tintes fluorescentes a los ácidos nucleicos permite la cuantificación precisa de ADN nuclear en espermatozoides, en algunos casos, sin afectar la viabilidad celular. Muchas tinciones han sido utilizadas, pero solo después de la utilización del bis-bencimidazol Hoechst 33342 (H33342) para teñir espermatozoides intactos, la cuantificación del ADN mediante fluorescencia fue exitosa (Johnson *et al.*, 1987; Martínez-Pastor *et al.*, 2010). El H33342 es una tinción para células vivas que penetra la membrana celular y se une selectivamente a los pares de bases A - T a lo largo del surco menor del ADN de doble cadena. Por lo general, se excita con una láser de Argón de 351 o 364 nm u otras fuentes de excitación de fluorescencia, tales como lámparas de mercurio, por lo que es muy útil en la evaluación cuantitativa del ADN celular. La mayoría de las tinciones se intercalan entre los pares de base del ADN, por lo tanto, presumiblemente incrementan su mutagenicidad. Sin embargo, el H33342 no es una tinción que se intercale, lo cual hace que su utilización sea más segura (Walkins *et al.*, 2006). La unión del H33342 puede ser tóxica cuando se emplean altas dosis, es por eso que debe ser utilizado con precaución. La unión del H33342 al ADN es estabilizada por una combinación puentes de hidrógenos, fuerzas de van der-Waals e interacciones electroestáticas entre la molécula que tiñe y la carga negativa del ADN. Células muertas o moribundas en la población de células teñidas con H33342 pueden ser identificadas agregando Ioduro de Propidio (PI). Actualmente, las clásicas tinciones han sido reemplazadas por FD & 40 para evitar un potencial efecto mutagénico del PI (Johnson & Welch, 1999; Schenk *et al.*, 1999). Los espermatozoides que demuestran daño pueden ser removidos durante el proceso de sorting o sexado.

Principios de citometría de flujo y sorting para sexar espermatozoides.

En el caso de los bovinos, los espermatozoides X que producen crías hembra (terneras) contienen en promedio 3,8 % más ADN que los espermatozoides Y que producen crías machos. La calidad y concentración espermática de los eyaculados son quizás los factores más importantes para obtener una buena separación de las dos poblaciones espermáticas. Así lo demuestran resultados que indican una alta correlación entre la motilidad espermática, la concentración y la separación de las poblaciones en un citómetro de flujo de alta velocidad. Por ende, la separación de espermatozoides X e Y se lleva a cabo normalmente en eyaculados con más del 50 % de espermatozoides con motilidad progresiva y 75 % de espermatozoides normales (Schenk *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 2002; Sharpe & Evans). El semen se incuba con un colorante que tiñe el ADN de los espermatozoides (Hoechst 33342), el cual tiene la particularidad de emitir una fluorescencia cuando es sometido a la luz láser. Por lo tanto, a mayor cantidad de ADN (espermatozoides con cromosoma X), mayor fluorescencia. Para detectar un posible diferencial en la fluorescencia y separar los espermatozoides se utiliza un citómetro de flujo. El mismo, consiste en un circuito cerrado de alta velocidad de flujo de líquidos que permite alinear y "leer" los espermatozoides individualmente suspendidos en microgotas. La fluorescencia que produce cada espermatozoide teñido es procesada por un software que permite al operador seleccionar la población espermática con mínima o máxima luminosidad. Los espermatozoides elegidos son cargados eléctricamente, desviados del flujo original en un campo magnético y finalmente colectados en un tubo para su posterior uso. Aproximadamente del total de espermatozoides sometidos al proceso de sexaje, un 20 % termina colectado en la fracción X y un 20 % en la fracción Y; el 60 % restante lo constituyen espermatozoides que no pudieron ser detectados por la técnica, espermatozoides muertos y gotas sin espermatozoides. El semen sexado se presenta comercialmente congelado, en pajuelas de 0,25 ml. Las mismas contienen 2 ó 10 x 10⁶ espermatozoides. La dosis menor se utiliza normalmente en inseminación artificial y fecundación *in vitro* y la mayor en transferencia embrionaria. La velocidad de separación utili-

zada actualmente permite obtener 7 pajuelas de 2 x 10⁶ espermatozoides X e igual número de Y por hora (Schenk *et al.*, 2009; Sharpe & Evans).

Para controlar la calidad del semen, se descongela una pajuela por partida y se evalúa la motilidad progresiva y la pureza (proporción del sexo deseado) de las dosis producidas. Las mismas, deben presentar un mínimo de 35 % de motilidad progresiva y 85 % de certeza del sexo para alcanzar los estándares de aprobación (Medina *et al.*, 2002). Los resultados de certeza en el sexo elegido son superiores al 90 % y tienen alta repetibilidad. Además, en los trabajos analizados donde se consideró la normalidad de los terneros nacidos, no hubo diferencias con los grupos controles provenientes de hembras inseminadas con semen convencional no sexado en cuanto a: abortos, mortalidad neonatal, peso al nacer, tasa de mortalidad e incidencia de anomalías (Seidel *et al.*, 1999; Seidel, 2007; Bodmer *et al.*, 2009; Borchersen & Peacock, 2009; Martínez-Pastor *et al.*, 2010)

Los espermatozoides atraviesan un detector de fluorescencia de 90° uno de otro. Cada detector mide la intensidad de la fluorescencia resultante de la excitación del ADN teñido por luz, la cual usualmente es generada por un láser. Las longitudes de onda utilizadas dependen de la fuente de luz y de cómo la luz es filtrada. Es importante destacar que, si un láser de argón se usa como fuente de luz, los espermatozoides no están expuestos a las longitudes de onda ultravioleta bajas perjudiciales que son absorbidas por los ácidos nucleicos y proteínas.

La intensidad de la señal fluorescente depende obviamente del número de moléculas fluorescentes unidas al ADN. Esta es la base para la determinación del sexo de los espermatozoides. Además, la señal depende de otros parámetros, incluyendo la intensidad del láser y cómo es pulsado, además de las propiedades ópticas de todo el sistema y la sensibilidad de los detectores (Guthrie *et al.*, 2002).

El principal obstáculo para la cuantificación del ADN espermático con esta técnica es al forma de la cabeza espermática, que en la mayoría de las especies de interés productivo tiene forma de paleta. La intensidad de la fluorescencia

cia será baja si la "cara plana" está orientada hacia el detector y mas alta cuando lo está el "borde". La orientación "plana" resulta en una discriminación más sensible entre espermatozoides X e Y, por lo que solo los espermatozoides orientados de esta forma serán sexados. Como la señal de fluorescencia es mayor en espermatozoides orientados con su borde hacia el detector de 90°, solo estos espermatozoides serán considerados para determinar el sexo adecuadamente. Dado que la orientación de espermatozoide es al azar con respecto a los detectores en una corriente cilíndrica de suspensión espermática, sólo alrededor del 10 % de los ellos estarán bien orientados y serán considerados para una medición precisa. Es por esto que se han realizado esfuerzos considerables con el objetivo de aumentar este porcentaje mediante la modificación de la geometría de la corriente cilíndrica del flujo de espermatozoides (Johnson & Welch, 1999; Rens *et al.*, 1998, 1999). Aunque los detalles no serán revisados con la tecnología actual, el 70 % aproximado de los espermatozoides presentan la orientación correcta (Johnson & Welch, 1999).

¿Qué tan rápido puede el citómetro de flujo clasificar células espermáticas?.

Actualmente los citómetros de flujo clasifican espermatozoides a tasas que son comercialmente viables y a velocidades de 90 Kms/h-1. Señales fluorescentes desde dos detectores de 90 °C uno de otro producen una tasa de medición de sobre 180.000 detecciones por segundo, la información es procesada por un computador y retransmitida por un mecanismo de corrientes de cargas cuando los espermatozoides son desplazados a pocos centímetros de éste. De manera que se forma una gota que contiene un espermatozoide X con diferente carga eléctrica al espermatozoide Y. El ordenador es tan rápido y sensible que una gota podría contener dos espermatozoides – X e Y – y aún éstas pueden ser clasificadas, mientras que gotas con espermatozoides muertos o desorientados pueden ser descartados. Por lo general, el sexaje de casi todos los espermatozoides no-humanos se realiza con alta precisión, a alta velocidad en un citómetro de flujo construido por Cytomation Inc (Fort Collins, CO) modelo MoFlo® SX equipado con un láser de argón, detectores para la fluorescencia y una boquilla de orientación es-

pecialmente modificada para los espermatozoides y desarrollada por Rens *et al.* (1998,1999). Teóricamente, los espermatozoides miden en promedio 100 micras de longitud, si ellos están perfectamente alineados (cabeza – cola) cerca de 200.000 espermatozoides podrían pasar a través de un detector por segundo, y aún mas si solo el tamaño de la cabeza fuera considerado. Existen descripciones que relacionan la distribución de los espermatozoides con la distribución de Poisson. Esto quiere decir que existe un espacio considerable entre cada espermatozoide que fluye. Si la concentración espermática aumenta, en promedio se acorta este espacio y los espermatozoides se agrupan, y para propósitos prácticos, las señales fluorescentes que ellos proyectan están demasiado juntas para que el sistema pueda procesarlas por separado, lo que resulta en una alteración de la técnica. Además, se ha descrito que algunos espermatozoides permanecen "entre las gotas", por lo que no se puede identificar a qué gota pertenece dicho espermatozoide, en este caso ambas gotas son descartadas (denominado "interrupción" o "abort"). Técnicamente el rendimiento óptimo se logra cuando "pasan" alrededor de 25.000 espermatozoides por segundo ("even rate"). Esta última puede ser cambiada modificando la concentración de espermatozoides en la muestra. Sin embargo, no hay beneficios netos sobre los 25.000 espermatozoides por segundo debido a un aumento en la tasa de interrupción y daño espermático.

Otro factor a considerar, son las limitaciones físicas del tamaño de la gota. Éstas se forman a partir de un flujo columnar producido por un inyector debido a vibraciones predeterminadas creadas por un mecanismo piezo-eléctrico, incluso previo al paso de los espermatozoides en los detectores. La frecuencia de las vibraciones debe coincidir con las características del inyector tales como el diámetro, viscosidad del fluido y la presión del sistema. En síntesis, un inyector de 70 µm, pueden formar casi 70.000 gotas por segundo a presiones de 40 psi, sin embargo disminuye a presiones bajas y diámetros amplios. Lo ideal es formar tantas gotas por unidad de tiempo como sea posible sin intervenir con otras propiedades del sistema, como la orientación de los espermatozoides.

Eficiencia del sexaje espermático. Existe una posibilidad perder espermatozoides en casi todas las etapas del procedimiento. Las pérdidas son altamente dependientes de las propiedades de la tinción de una muestra en particular, así como la habilidad del técnico encargado del procedimiento. La eficiencia acumulada de la técnica a un 90 % de precisión en la clasificación de los espermatozoides es de un 22 % (11 % de cada sexo). Además, se considera un 10 % de espermatozoides descartados o no-viables. La eficiencia varía como resultado de la calidad de la muestra y de la velocidad del flujo de espermatozoides a través del sistema. Bajo condiciones prácticas, solo una fracción del eyaculado es sexado debido a que el proceso es relativamente lento en relación al número de espermatozoides disponibles. Debido a que las células espermáticas se someten a diferentes tipos de estrés durante el sexaje, las muestras de semen fresco han demostrado tener mayor tolerancia que muestras que han sido criopreservadas. Respecto a estas consideraciones, el número de espermatozoides disponibles en un eyaculado para sexar determinará la cantidad de espermatozoides disponibles para clasificar y cuantos no serán sexados.

Los datos en bruto de los citómetros de flujo se pueden expresar de muchas maneras. La forma más sencilla es presentar sólo los datos de la fluorescencia obtenidos del detector de 0° para espermatozoides orientados adecuadamente, espermatozoides viables, es decir, aquellos que presentan una fluorescencia máxima con el detector de 90° (Johnson & Welch, 1999). Los espermatozoides mal orientados, o gotas con dos espermatozoides, no reciben carga eléctrica cuando salen por el inyector, por tanto, se desecha en el flujo de residuos. De la distribución de la fluorescencia de espermatozoides X e Y resulta un solapamiento de dos distribuciones bimodales. Una región sombreada se establece al producir dos poblaciones solapadas de espermatozoides sexados con un 90 % de precisión, esta región entre ambas curvas refleja la magnitud del solapamiento entre ambas poblaciones, en la cual es imposible distinguir entre espermatozoides X o Y. Estos espermatozoides son descartados. Los espermatozoides ubicados en los extremos de las colas de las curvas a menudo presentan cromosomas sexuales extras

o son células aneuplóidicas. La región no solapada, corresponde a la población de espermatozoides X e Y puros, las cuales deben ser mayores a las células de descarte.

Daño espermático durante el sexaje. La capacidad fecundante de los espermatozoides sexados es algo menor que los controles (Seidel *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2000), así como la sobrevivencia de espermatozoides sexados posterior a la criopreservación (Schenk *et al.*, 1999). Desafortunadamente, la mayoría de los estudios sobre la fertilidad con espermatozoides sexados son confusos debido a la utilización de una dosis inferior a lo indicado en protocolos estándar de inseminación. Cuando se han utilizado números similares de espermatozoides por dosis, las tasas de preñeces con espermatozoides sexados por lo general han sido 60-80 % respecto a un control no sexado (Seidel *et al.*, 1999). Las pérdidas fetales durante los primeros dos meses de gestación han sido 1-2 % más alta con dosis bajas de espermatozoides sexados que con las dosis normales de IA de espermatozoides sin sexar (Seidel *et al.*). Un gran número de animales se necesitarán para determinar si este es un efecto real, o si esta diferencia no significativa se disipará con un estudio más exhaustivo. Existe un estudio reciente respecto al daño en el ADN y a la mortalidad espermática en espermatozoides sexados, sometidos a varias combinaciones de fuerzas mecánicas a 50 psi, expuestos al láser y a procedimientos de tinción durante el sexaje. Espermatozoides sexados fueron analizados por citometría de flujo tanto para la integridad de del ADN como para la tinción de yoduro de propidio como medida de espermatozoides muertos. La mayor parte de los daños se deben simplemente al procesamiento de los espermatozoides durante el sexaje, aun cuando éstos no presentan tinción o no han sido expuestos al laser de argón. El daño adicional, de acuerdo a otros estudios, debido a la exposición al laser es mínimo y no estadísticamente significativo (Libbus *et al.*, 1987; Guthrie *et al.*, 2002). Estudios indican que gran parte del daño mecánico observado durante el proceso de sexaje puede ser disminuido mediante la reducción de la presión del fluido. Ha sido demostrado que esto mejora la capacidad fecundante de espermatozoides sexados que hasta el momento habían sido expuestos (sexados) a procedimientos de 50psi.

Miles de crías de diferentes especies mamíferas (bovino, porcino, conejos, equinos, ovinos y seres humanos entre otros), pero principalmente ganado vacuno se han obtenido después de utilizar la tinción H33342 y sexar espermatozoides fecundantes mediante citometría de flujo. Anormalidades letales en las crías no han sido reportadas (Morrell & Dresser, 1989; Johnson, 1995; Catt *et al.*, 1997; Fugger, 1999; Johnson & Welch, 1999; Seidel *et al.*, 1999). Esto indicaría que el ADN de los espermatozoides sexados no se altera durante el procedimiento de sexado. Se han realizado diferentes estudios para evaluar la normalidad de las crías obtenidas con semen sexado. Ha sido reportado un estudio (Schenk *et al.*, 1999; Seidel *et al.*, 1999), en el cual en vaquillas Angus fueron inseminadas con semen congelado, sexado y no-sexado. Todos los tratamientos fueron "ciegos". Algunas vaquillas fueron inseminadas con espermatozoides portadoras del cromosoma X y otros con espermatozoides que portaban el cromosoma Y, en función de las genealogías y el valor comercial de los terneros resultantes. No hubo diferencias significativas en las tasas de preñez evaluadas a los dos meses post inseminación artificial en hembras inseminadas con dosis sexada (53 %), sin embargo, la tasa de preñez del control fue mayor (66 %). Entre los 2 meses y el término de la gestación, se reportó un 4,7 y 5,4 % de abortos en animales del grupo control y tratamiento respectivamente detectándose una diferencia muy pequeña entre los grupos evaluados, sin embargo no se detectó una significancia estadística. No hubo diferencias en las tasas de muerte neonatal hasta el destete entre las crías obtenidas con semen sexado frente al control, ni tampoco diferencias en la duración de la gestación, el peso al nacer o peso al destete. Tampoco se observó anomalías congénitas. La única diferencia se detectó en el peso de nacimiento entre machos y hembras de los animales. De acuerdo a esto, no parece que existan evidencias que reflejen efectos perjudiciales en el sexaje de espermatozoides en la descendencia resultante. Aún cuando en este estudio hay resultados obtenidos de 370 inseminaciones, un tamaño muestral respetable, son necesarios mayores antecedentes que aseguren que no existen alteraciones en la descendencia producida con semen sexado. Además, el periodo

de tiempo que permanecen viables en el tracto reproductor de la hembra aquellos espermatozoides sexados que no alcanzan a fecundar un ovocito ameritan estudios posteriores.

Otros métodos

Además de citometría de flujo de fluorescencia y la clasificación de células basadas en el contenido de ADN, la separación de los espermatozoides que contienen el cromosoma Y de aquellos que contienen el cromosoma X, se ha intentado con una variedad de otras técnicas.

Separación por gradiente "Swim-down": separación exitosa de espermatozoides con contienen el cromosoma X o Y utilizando un gradiente de albúmina fue reportado por primera vez por Ericsson *et al.* (1973). La base conceptual de esta técnica es que los espermatozoides que contienen el cromosoma Y son de menor tamaño y presentan una mayor velocidad de nado "hacia abajo" que los espermatozoides que contienen el cromosoma X dentro de una columna vertical de alta densidad de albúmina de suero humano (Ericsson *et al.*, 1973). Nunca se ha demostrado la precisión de esta técnica en otros mamíferos que no sean humanos (White *et al.*, 1984). Por otra parte, no es posible éticamente hacer estudios rigurosos y prospectivos con espermatozoides sexados para documentar la eficacia de la técnica. Otro aspecto interesante de la utilización de esta técnica es observado cuando las mujeres son tratadas con citrato de clomifeno para inducir la ovulación previo a la IA, la proporción de sexos se invierte, de manera que pueden nacer hasta un 73 % de mujeres.

Diferencias antigénicas superficiales: Se han reportados varios estudios inmunológicos para determinar el sexo en mamíferos sin éxito (Hoppe & Koo, 1984; Hendriksen *et al.*, 1996; Hendriksen, 1999). Un enfoque era apuntar al antígeno H-Y. Sin embargo esta molécula parece estar presente en ambos cromosomas X e Y (Hoppe & Koo, 1984). Un enfoque inmunológico, sin embargo, sería altamente deseable ya que el procesamiento de este tipo sería considerablemente menos costoso que otras técnicas. Howes *et al.* (1997) sugirieron

que un enfoque inmunológico para sexaje de semen era poco factible. Un informe reciente sugiere que un procedimiento inmunológicos de sexado de espermatozoides viables puede ser desarrollado utilizando una técnica para aislar proteínas específicas del sexo (SSP; Blecher *et al.*, 1999). Hasta la fecha no existen reportes de producción de crías obtenidas con espermatozoides sexados con esta técnica a pesar de la considerable inversión de recursos a lo largo de varios años.

Electroforesis de flujo libre: la separación electroforética de espermatozoides X e Y se ha intentado por mucho tiempo sin éxito reportado. Este enfoque, se basa en la posibilidad de que la carga eléctrica en la superficie de los espermatozoides X difiere de los espermatozoides Y. La técnica utiliza un campo eléctrico para separar los espermatozoides (Kaneko *et al.*, 1984).

Sexaje espermático basado en diferencias volumétricas: la técnica se basa en que los espermatozoides que contienen un cromosoma X son teóricamente más grandes que los que contienen un cromosoma Y. Van Munster *et al.* (1999) utilizó microscopía de interferencia y análisis de imágenes para demostrar diferencias en el volumen de la cabeza del espermatozoide y además describió que éstas coincidían con el tipo de cromosoma (X o Y). Una técnica basada en este principio ha sido desarrollado para sexar espermatozoides vivos mediante el uso de microscopía óptica de interferencia con un citómetro de flujo (Van Munster, 2002), eliminando la necesidad de

utilizar colorantes específicos de ADN, sería una alternativa altamente atractivo para determinar el sexo de los espermatozoides de mamíferos. Por desgracia, la pureza potencial de espermatozoides separados valorados mediante medidas volumétricas no puede superar el 80 % de pureza en ambos sexos (Van Munster *et al.*, 1999; Van Munster, 2002).

Perspectivas

La comercialización de semen sexado se ha utilizado para el ganado bovino y es inminente su utilización para los equinos (Buchanan *et al.*, 2000). La metodología se está utilizando en una escala limitada para producir bebés humanos, en particular para generar niñas, y así evitar enfermedades genéticas ligadas al cromosoma Y (Johnson *et al.*, 1993; Fugger *et al.*, 1998; Vazquez *et al.*, 2009; Garner *et al.*, 2013). Esta revisión se ha centrado en el proceso real de determinación del sexo de los espermatozoides por citometría de flujo y clasificación de células e ilustra que el procedimiento es complicado y poco eficiente. Sin embargo, los procedimientos siguen mejorando. El sexaje de espermatozoides como se practica actualmente es caro, en parte debido a la ineficacia, al alto costo de los equipos y su mantenimiento. A pesar de estos costos y complejidades, el procedimiento funciona. Equipos mucho más sencillos, diseñados específicamente para el sexaje de espermatozoides probablemente estarán disponible en pocos años. Una vez mejorando la eficiencia y disminuyendo los costos de la técnica, el sexaje de espermatozoides se aplicará ampliamente.

SALINAS, P. Flow cytometry and sperm sexing in animals. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 3(3):893-902, 2016.

SUMMARY: Flow cytometry is a useful technology in the sexed sperm, which measures and analyzes simultaneously, multiple physical characteristics of the cell, as they flow in a stream flow, through a light beam. The measured properties are the size of a particle, relative internal granularity, relative complexity and relative fluorescence intensity. Currently, hundreds of calves have been gestated through artificial insemination with sexed sperm in animal production. Since 1992, flow cytometry has been used, a technique that allows spermatozoa X and Y differentiation by DNA content. There is no other practical technique for sperm sexing to keep sperm functionality. The objectives of this review are to explain: (1) why the sperm containing the X or Y chromosome are phenotypically similar, but differ among themselves, (2) the principles and procedures used for sexing sperm by flow cytometry and sorting (3) accuracy, speed and efficiency of current procedure sperm sexing, (4) sperm damage occurred during sperm sexing and consequently the effects on fertility.

KEY WORDS. Cytometry flow; Esperm; Sexing animals; Animals.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barlow, P. & Vosa, C.G. The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature*, 226:961-962, 1970.
- Blecher, S.R.; Howie, R.; Li, S.; Detmar, J. & Blahut, L. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology*, 52:1309-132, 1999.
- Bodmer, M.; Janett, F.; Hassig, M.; Den Daas, N.; Reichert, P. & Thun, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*, 64:1647-55, 2005.
- Borchersen, S. & Peacock, M. Danish A.I. field data with sexed semen. *Theriogenology*, 71:59-63, 2009.
- Buchanan, B.R.; Seidel, G.E.; McCue, P.M.; Schenk, J.L.; Herickhoff, L.A. & Squires, E.L. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 53:1333-44, 2000.
- Catt, S.L.; Sakkas, D.; Bizzaro, D.; Bianchi, P.G.; Maxwell, W.M.C. & Evans, G. Hoechst staining and exposure to UV laser during flow cytometric sorting does not affect the frequency of detected endogenous DNA nicks in abnormal and normal spermatozoa. *Mol. Human Reprod.*, 3:821-5, 1997.
- Ericsson, R.J.; Langevin, C.N. & Nishino, M. Isolation of fractions rich in Y spermatozoa. *Nature*, 246:421-4, 1973.
- Evans, J.M.; Douglas, T.A. & Renton, J.P. An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. *Nature*, 253:352-4, 1975.
- Fugger, E.F. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. *Theriogenology*, 52:1345-440, 1999.
- Fugger, E.F.; Black, S.H.; Keyvanfar, K. & Schulman, J.D. Births of normal daughters after Microsort spermatozoa separation in intrauterine insemination, IVF or ICSI. *Hum. Reprod.*, 13:2367-70, 1998.
- Garner, D.L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J. Androl.*, 22:519-26, 2001.
- Garner, D. L.; Evans, K. M. & Seidel, G. E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *Methods. Mol. Biol.*, 927:279-95, 2013.
- Guthrie, H.D.; Johnson, L.A.; Garrett, W.M.; Welch, G.R. & Dobrinsky, J.R. Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:87-92, 2002.
- Guyer, M.F. Accessory chromosomes in man. *Biol. Bull.*, 19:219-34, 1910.
- Hendriksen, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins?. *Theriogenology*, 52:1295-307, 1999.
- Hendriksen, P.J.M.; Welch, G.R.; Grootegoed, J.A.; Vander Lende, T. & Johnson, L.A. Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X- and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.*, 45:342-450, 1996.
- Herrmann, B.G.; Koschroz, B.; Wertz, K.; McLaughlin, K.J. & Kispert, A. A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance. *Nature*, 402:141-6, 1991.
- Hoppe, P.C. & Koo, G.C. Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Immunol.*, 6:1-9, 1984.
- Hossain, M. S.; Johannisson, A.; Wallgren, M., Nagy, S.; Siqueira, A. P. & Rodriguez-Martinez, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J. Androl.*, 13(3):406-19, 2011.
- Howes, E.A.; Miller, N.G.A.; Dolby, C.; Hutchings, A. Butcher, G.W. & Jones, R. A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. *J. Reprod. Fertil.*, 110:195-204, 1997.
- Johnson, L.A. Separation of X and Y chromosome bearing sperm based on DNA differences. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:893-903, 1995.
- Johnson, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 93-107, 2000.

- Johnson, L.A. & Seidel, G.E. Current status of sexing mammalian sperm. *Theriogenology*, 52:1267-1484, 1999.
- Johnson, L.A. & Welch, G.R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52:1323-41, 1999.
- Johnson, L.A.; Flook, J.R. & Look, M.V. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res.*, 17:203-12, 1987.
- Johnson, L.A.; Flook, J.P. & Hawk, H.W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.*, 41:199-203, 2003.
- Johnson, L.A.; Welch, G.R.; Keyvanfar, K.; Dorfmann, A.; Fugger, E.F. & Schulman J.D. Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases. *Hum. Reprod.*, 8:1733-9, 1993.
- Kaneko, S.; Oshiro, S.; Kobayashi, T.; Itzuka, R. & Mohri H. Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124:950-5, 1984.
- Libbus, G.L.; Perreault, S.D.; Johnson, L.A. & Pinkel, D. Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoechst 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting. *Mutat. Res.*, 182:265-74, 1987.
- Martinez-Pastor, F.; Mata-Campuzano, M.; Alvarez-Rodriguez, M.; Alvarez, M.; Anel, L. & de Paz, P. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod. Domest. Anim.*, 45(2):67-78, 2010.
- Medina, M.; Cattaneo, L.; Caballero, J.; Cerrate, H.; Panarace, M.; Ferré, L. & Dalla Lasta M. Semen sexado y congelado en Argentina. Resultados de su utilización en programas de inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *Taurus*, 13:4-8, 2002.
- Morrell, J.M. & Dresser, D.W. Offspring from insemination with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry. *Mutat. Res.*, 224:177-89, 1989.
- Muratori, M.; Tamburrino, L.; Marchiani, S.; Guido, C.; Forti, G. & Baldi, E. Critical aspects of detection of sperm DNA fragmentation by TUNEL/flow cytometry. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 56(4):277-285, 2010.
- Ollero, M.; Perez-Pe, R.; Gargallo, I.; Morlanes, S.; Osada, J.; Muiño-Blanco, T. & Cebrian-Perez, J. Separation of ram spermatozoa bearing X and Y chromosome by centrifugal countercurrent distribution in an aqueous two-phase system. *J. Andro.*, 21:921-8, 2000.
- Rens, W.; Welch, G.R. & Johnson, L.A. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X- and Y-chromosome-bearing sperm. *Cytometry*, 33:476-81, 1998.
- Rens, W.; Welch, G.R. & Johnson, L.A. Improved flow cytometric sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm: substantial increase in yield of sexed sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 52:50-6, 1999.
- Schenk, J.L.; Suh, T.K.; Cran, D.G. & Seidel, G.E. Cryopreservation of flow-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 52:1375-91, 1999.
- Schenk, J.L.; Suh, T.K.; Cran, D.G. & Seidel, G.E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 52:1375-91, 1999.
- Schenk, J.L.; Cran, D.G.; Everet, R.W. & Seidel, G.E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effect of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*, 71:717-28, 2009.
- Sharpe, J.C. & Evans, K.M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*, 71:4-10, 2009.
- Seidel, G.E. Sexing mammalian spermatozoa and embryos - state of the art. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 54:475-85, 1999.
- Seidel, G.E.; Schenk, J.L.; Herickhoff, L.A.; Doyle, S.P.; Brink, Z.; Green, R.D. & Cran, D.G. Insemination of heifers with sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 52:1407-20, 1999.
- Sharpe, J.C.; Schaare, P.N. & Künnemeyer, R. Radially symmetric excitation and collection optics for flow cytometric sorting of aspherical cells. *Cytometry*, 29:363-70, 1997.
- Sharpe, J. C. & Evans, K. M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*, 71(1):4-10, 2009.

van Munster, E.B. Interferometry in flow to sort unstained X- and Y-chromosome bearing bull spermatozoa. *Cytometry*, 47:192-9, 2002.

van Munster, E.B.; Stap, J.; Hoebe, R.A.; te Meerman, G.J. & Aten, J.A. Difference in volume of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm heads matches differences in DNA content. *Cytometry*, 35:125-8, 1999a.

van Munster, E.B.; Stap, J.; Hoebe, R.A.; te Meerman, G.J. & Aten, J.A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: potential and limitations. *Theriogenology*, 52:1281-93, 1999b.

Vazquez, J. M.; Parrilla, I.; Roca, J.; Gil, M. A.; Cuello, C.; Vazquez, J. L. & Martinez, E.A. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology*, 71(1):80-8, 2009.

Dirección para correspondencia:
Dr. Paulo Salinas Pérez
Universidad Santo Tomás
Temuco
CHILE

Email: psalinas@santotomas.cl

Recibido : 23-06-2016

Aceptado: 18-07-2016