



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**



**EFFECTO DE LA PENTOXIFILINA O MIOINOSITOL SOBRE LOS PARÁMETROS
DE MOTILIDAD, CINÉTICA Y FERTILIDAD *IN VITRO* DEL SEMEN SEXADO Y
NO SEXADO BOVINO CRIOPRESERVADO**

“por”

Franco ALVIRA SAN MARTÍN

Fabián RODAO VIDAL

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2022**

PÁGINA DE APROBACIÓN

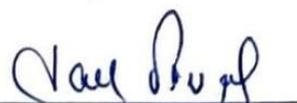
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Nicolás Cazales

Segundo miembro (tutor)



Dra. Yael Filipiak

Tercer miembro:



Dra. Florencia Beracochea

Cuarto miembro:



Dr. Danilo Fila

Quinto miembro:

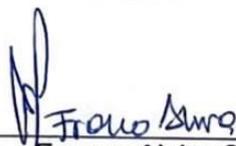


Dr. Jorge Gil

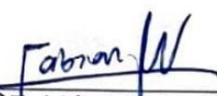
Fecha:

19 de diciembre del 2022

Autores:



Franco Alvira San Martín



Rabián Rodao Vidal

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora, Dra. Yael Filipiak por el apoyo y enseñanza brindada en el proceso de nuestro trabajo.

A los Dres. Jorge Gil y Danilo Fila por formar parte del equipo.

A los ayudantes Valentina Álvarez y Marcos Pereira por su colaboración en el laboratorio de reproducción animal, y a Sabrina Suarez por su asesoramiento en redacción.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil (PAIE, CSIC) (2020) por la financiación del proyecto.

A instituciones que permitieron la realización del trabajo, Frigorífico las Piedras, Instituto de Producción Animal (IPAV), y a nuestra querida casa de estudios, Facultad de Veterinaria (UdelaR).

A nuestros familiares y amigos por el apoyo incondicional en todo el transcurso de nuestra carrera.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	133
4.1 DATOS NACIONALES Y MERCADOS	133
4.2 SEMEN SEXADO	144
4.3 MÉTODOS DE SEXADO	15
4.3.1 CITOMETRÍA DE FLUJO	155
4.3.2 SEXCEL	166
4.4 CASA	166
4.5 PRODUCCION <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES	168
4.6 ESTRÉS OXIDATIVO	20
4.7 MIOINOSITOL	211
4.8 PENTOXIFILINA	222
HIPÓTESIS	233
OBJETIVOS	233
6.1 OBJETIVO GENERAL	233
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	233
MATERIALES Y MÉTODOS	233
7.1 Experimento 1	233
7.2 Experimento 2	266
RESULTADOS	277
8.1 Experimento 1	277
8.2 Experimento 2	31
DISCUSIÓN	31

CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	45

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de algunos de los patrones de motilidad medidos por CASA. Los círculos negros representan imágenes sucesivas (centroides) de la cabeza de un espermatozoide móvil. Valverde & Madrigal (2018).	19
Figura 2: Correlación entre las variables y fertilidad de toros. Adaptada de Farrel <i>et al.</i> , 1998.	20
Tabla 1: Cronología de trabajo	25
Tabla 2: Cinética espermática a la incubación del SN y SX para cada tratamiento.	27
Tabla 3: Cinética espermática a la capacitación del SN y SX para cada tratamiento.	28
Tabla 4: Cinética espermática a las 2 hs (termorresistencia) del SN y SX para cada tratamiento.	28
Figura 3: Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de SN tras incubación, capacitación y termorresistencia.	29
Figura 4: Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de SX tras incubación, capacitación y termorresistencia.	29
Tabla 5: Porcentaje de espermatozoides progresivos por dosis, concentración espermática y porcentajes de motilidad de las muestras de SN y SX luego de la incubación.	30
Tabla 6: Porcentaje de espermatozoides progresivos por dosis, concentración espermática y porcentajes de motilidad de las muestras de SN y SX luego de la capacitación.	30
Tabla 7: Porcentaje de espermatozoides progresivos por dosis, concentración espermática y porcentajes de motilidad de las muestras de SN y SX luego de 2hs de incubación en baño de maría (termorresistencia).	31
Tabla 8: Clivaje y desarrollo embrionario en FIV con los distintos tratamientos sobre SN y SX.	32

1. RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la Pentoxifilina (PTX) y Mioinositol (MI) luego de la incubación, a las 2 horas (termorresistencia) y poscapacitación sobre la motilidad, cinética y fertilidad *in vitro* (FIV) del semen bovino no sexado (SN) y sexado (SX). Se realizaron 2 experimentos para los cuales se utilizó SN y SX del mismo toro y de la misma partida. 1) Se evaluó el efecto de la PTX y el MI sobre el semen utilizando el sistema CASA. Se estudiaron los parámetros de motilidad general y progresiva, velocidad y recorrido de la trayectoria circular, trayectoria recta y promedio, oscilación e hiperactivación. Se formaron 6 grupos: SN-C: SN con TCM-199; SN-PTX: SN con TCM-199 adicionado con PTX; SN-MI: SN con TCM-199 adicionado con MI; SX-C: SX con TCM-199; SX-PTX: SX con TCM-199 adicionado con PTX; SX-MI: SX con TCM-199 adicionado con MI. Todos los grupos se incubaron durante 30 minutos y se evaluaron en CASA. Se incubaron 2 horas para evaluar la termorresistencia en CASA. Se centrifugaron para su capacitación en medio Brackett & Oliphant (1975) (BO) con Cafeína y Heparina, seguido de lavado y dilución en medio BO de fertilización y evaluación en CASA. Los datos se analizaron con ANOVA, aquellos que arrojaron diferencias significativas fueron analizados con test de Student para identificar qué grupos diferían, en ambos casos, se utilizó un nivel de significación del 5%. 2) Pruebas de FIV: Se aspiraron complejos cúmulus ovocitos (COC) de folículos de 2-8mm de ovarios bovinos de menos de 5 horas de faenados, en buffer fosfato salino modificado (m-PBS), con 5% de suero fetal bovino (SFb) y antibióticos. Se seleccionaron los COC clase A. Se lavaron y cultivaron para maduración en TCM con 5% SFb y hormonas, en gotas de 100µl, 15 COC/gota, cubiertos con aceite mineral, en incubadora (a 38,5°C, 5% de CO₂ y 95% humedad) por 22 horas. Las pajuelas de semen fueron procesadas e incubadas de acuerdo a los grupos experimentales mencionados. Cada grupo fue capacitado y se estudió la concentración en cámara de Neubauer, ajustándola a 2×10^6 espermatozoides(esp)/ml. Los COC fueron divididos en 6 grupos de similar número e inseminados con el semen tratado de los distintos grupos (SN-C, SN-PTX, SN-MI, SX-C, SX-PTX, SX-MI). Se formaron gotas de 100µl con semen, cubiertas con aceite mineral y se cocultivaron con los COC por 18 horas. Los presuntos cigotos se lavaron, desnudaron con vortex y se cultivaron en medio CR1aa con 5% de SFb. Se evaluó el clivaje a las 48 horas. A los 7 días se evaluó el desarrollo embrionario y su calidad de acuerdo a las normas de la IETS. Se analizaron los resultados por Chi cuadrado, con significación del 5%. Como resultados del experimento 1, en incubación del SN se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la frecuencia de cruzamientos (BCF) para los tratamientos con PTX y MI. Con respecto a la evaluación realizada a las 2 horas, se evidenciaron mayores resultados en la velocidad curvilínea (VCL), velocidad de trayectoria media (VAP) e índice de hiperactivación (HAC) ($p < 0,05$) en el semen tratado con PTX con respecto a los otros grupos experimentales. En esta misma evaluación, el índice de oscilación (WOB) mostró un resultado estadísticamente menor respecto a los demás grupos ($P < 0,01$). Al comparar el efecto de los diferentes tratamientos sobre el SX, se halló un aumento significativo en VCL y VAP durante la incubación en los grupos tratados con MI y PTX ($p < 0,05$). Evaluando la termorresistencia a las 2 horas fue mayor HAC ($p < 0,05$) en el semen tratado

con PTX. Los valores de motilidad progresiva para el SN durante la incubación fueron de 73,73%, 40,08%, 61,85%, con un desvío de 17,1% para el grupo control, y los adicionados con PTX y MI respectivamente. Tras la capacitación, los valores fueron 15,2%, 10,2%, 7,17%, con un desvío de 4,06% para el grupo control, y los adicionados con PTX Y MI respectivamente; y para la termorresistencia medida a las 2 horas de incubación, los valores fueron 32,18%, 32,96%, 47,39%, con un desvío de 8,57% para los mismos grupos. Para el SX, los valores de motilidad progresiva durante la incubación fueron de 9,01%, 9,12%, 14,58%, con un desvío de 3,18%, para la capacitación 7,15%, 5,66%, 4,23%, con un desvío de 1,46%, y para la termorresistencia 13,96%, 9,42%, 7,53%, con un desvío de 3,30% para el grupo control y los adicionados con PTX y MI respectivamente. El experimento 2 demostró un mayor desarrollo embrionario a favor del uso de MI (63,8%) ($p=0,02$) con respecto al grupo control (42,4%), y una tendencia a mejorar sobre el uso de PTX (46,8%) ($p=0,06$) con el SX. Se concluye que está justificado el uso de los aditivos antes mencionados cuando se trabaje con SX.

2. SUMMARY

The objective was to evaluate the effect of Pentoxifylline (PTX) and Myoinositol (MI) after incubation, at 2 hours (thermal resistance) and postcapacitation on motility, kinetics and *in vitro* fertilization (IVF) of non-sexed (SN) and sexed bovine semen (SX). Two experiments were performed using SN and SX from the same bull and from the same batch. 1) The effect of PTX and MI on semen was evaluated with CASA System. The parameters of general and progressive motility, speed and course of the circular trajectory, straight and average trajectory, oscillation and hyperactivation were studied. Six groups were made: SN-C: SN with TCM-199; SN-PTX: SN with TCM-199 with PTX added; SN-MI: SN with TCM-199 with MI added; SX-C: SX with TCM-199; SX-PTX: SX with TCM-199 with PTX added; SX-MI: SX with TCM-199 with MI added. All groups were incubated for 30 minutes and evaluated with CASA system. They were incubated for 2 hours to evaluate the thermal resistance with CASA. They were centrifuged for capacitation in Brackett & Oliphant (1975) (BO) medium with Caffeine and Heparin, followed by washing and dilution in BO fertilization medium and evaluation with CASA. They were analyzed with ANOVA, those that showed significant differences were analyzed with Student's t test to identify which groups differed, in both cases a significance level of 5% was used. 2) IVF tests: Cumulus oocyte complexes (COC) were aspirated from 2-8mm follicles of bovine ovaries less than 5h after slaughter, into modified phosphate buffered saline (m-PBS), with 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Class A COCs were selected. They were washed and cultured for maturation in TCM with 5% FBS and hormones, in drops of 100 μ l, 15 COC/drop, covered with mineral oil, in an incubator (at 38,5°C, 5% CO₂ and 95% humidity), for 22 hours. The semen straws were processed and incubated according to the experimental groups mentioned. Each group was capacitated and the concentration was studied in the Neubauer chamber, adjusting it to 2x10⁶ spz/ml. The COCs were divided into 6 groups of similar number and inseminated with the treated semen of the different groups (SN-C, SN-PTX, SN-MI, SX-C, SX-PTX, SX-MI). 100 μ l drops were made with semen, covered with mineral oil and cultured with the COCs for 18 hours. Possible zygotes were washed, vortex stripped and cultured in CR1aa medium with 5% FBS. Cleavage was evaluated at 48 hours. At 7 days, embryonic development and quality were evaluated according to IETS standards. The results were analyzed by Chi square test, with significance of 5%. The results of experiment 1, in the SN incubation, showed a significant decrease ($p < 0,05$) in beat cross frequency (BCF) for treatments with PTX and MI. Regarding the evaluation carried out at 2 hours, higher results were observed in curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP) and hyperarousal (HAC) ($p < 0,05$) in the semen treated with PTX with respect to the other experimental groups. In this same evaluation, wobble (WOB) showed a statistically lower result compared to the other groups ($P < 0,01$). Comparing the effect of the different treatments on SX, a significant increase in VCL and VAP was found during incubation in the groups treated with MI and PTX ($p < 0,05$). Evaluating the thermal resistance at 2 hours, HAC was higher ($p < 0,05$) in the semen treated with PTX. The values of progressive motility for SN during incubation were 73,73%, 40,08%, 61,85%, with a deviation of 17,1% for the control group, and those added with PTX and MI,

respectively. After capacitation, the values were 15,2%, 10,2%, 7,17%, with a deviation of 4,06% for the control group, and those added with PTX and MI, respectively; and for the thermal resistance measured after 2 hours of incubation, the values were 32,18%, 32,96%, 47,39%, with a deviation of 8,57% for the same groups. For the SX, the values of progressive motility during incubation were 9,01%, 9,12%, 14,58%, with a deviation of 3,18%, for capacitation 7,15%, 5,66%, 4,23% with a deviation of 1,46%, and for thermal resistance 13,96%, 9,42%, 7,53%, with a deviation of 3,30% for the control group and those added with PTX and MI, respectively.

Experiment 2 proved a greater embryonic development favoring the use of MI (63,8%) ($p=0,02$) respect to the control group (42,4%), and a tendency to improve over the use of PTX (46,8%) ($p=0,06$) in SX. It is concluded that the use of the aforementioned additives is justified when working with SX.

3. INTRODUCCIÓN

Con la creciente adopción de tecnologías reproductivas, es fundamental conocer el efecto que nos pueden brindar los diferentes aditivos usados sobre el semen y/u ovocitos para mejorar diferentes parámetros que redunden en mejores tasas de preñez. Con ese fin nos embarcamos en estudiar el efecto del mioinositol (MI) y pentoxifilina (PTX) sobre semen sexado (SX) y semen convencional (SN), con el objetivo de poder avalar estudios anteriormente realizados, aportar nuevos resultados, y brindar a la comunidad otras opciones en pro de mejorar futuros resultados.

Actualmente en Uruguay, no se procesa SX debido a que la técnica no está estandarizada, entre otras cosas porque el flujocitómetro cuesta aproximadamente U\$S 280.000, debido a esto, el SX que se utiliza es importado y de un alto costo, entre U\$S 30 y 60 la pajueta en promedio.

La técnica más desarrollada para el sexado de semen es el flujocitómetro, con la clasificación del semen a partir del ADN por su cromosoma sexual. Sus avances constantes permiten seleccionar el sexo en el ganado, lo cual es un aporte con un futuro trascendental en la ganadería bovina. El citómetro de flujo puede detectar una pequeña diferencia entre los cromosomas X e Y (4% más ADN para cromosoma X en bovinos) y los separa con precisiones de alrededor de un 90% (Xu, Chaubal & Du, 2009). Esta poderosa tecnología para predeterminar el sexo en animales domésticos fue usada satisfactoriamente en varias especies, entre ellas conejos (Johnson, Flook, & Hawk, 1989), ovejas (Evans, Hollinshead & Maxwell, 2004), cerdos (Rath *et al.*, 1999), caballos (Lindsey, Bruemmer & Squires, 2001), y ganado (Seidel Jr *et al.*, 1999).

Sin embargo, su aplicación en inseminación artificial (IA) resulta en una menor tasa de preñez con respecto al uso de SN debido a la baja concentración de espermatozoides en cada dosis de SX (1,5-2 millones esp/pajueta de 0,25 ml), a causa de que la velocidad de producción es lenta (Xu *et al.*, 2009).

En la actualidad, se han desarrollado otras técnicas para el sexado de semen basadas en el mismo principio de la citometría de flujo (clasificación por contenido de ADN) como Sexcel®, tecnología que se apoya en la tinción de los espermatozoides según su contenido de ADN y posterior destrucción mediante láser de aquellos espermatozoides del género no deseado, quedando los gametos destruidos en la pajueta sin alterar las tasas de concepción. En cuanto a la pureza, el 87,2% en promedio eran portadores de X; mientras que para el SX por citometría de flujo se evidencia la obtención de semen con un contenido superior de espermatozoides del sexo deseado (Urbina, 2012; Faust, Betthausen, Crego & Storch, 2016).

Cuando se usa SX en IA, con cada pajueta que contiene $1,5-2 \times 10^6$ (citometría de flujo), $2,8 \times 10^6$ (Sexcel) de espermatozoides, en el mejor de los casos se fertiliza un ovocito in vivo. En cambio, en fertilización *in vitro* (FIV), técnica llevada a cabo en laboratorio en la que se controlan los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femeninos y masculinos para producir embriones (Filipiak & Larocca, 2010), con tan solo 1000 espermatozoides se puede fertilizar un ovocito (Yang, Jiang & Foote, 1993).

Por ser la FIV una alternativa para el uso del SX, sumada al auge de la aplicación de

la técnica de aspiración folicular *in vivo* guiada por ultrasonografía, ovum pick up (OPU-por su siglas en inglés), traería mayores beneficios a la producción lechera al incrementar los nacimientos de hembras bovinas de alto valor a menor costo, obtenido de una hembra genéticamente superior, mayor número de crías por año, aumento en la capacidad de selección de hembras de reemplazo y reducción de nacimientos de machos que, generalmente, no son deseados productivamente en los hatos lecheros.

La FIV también constituye un modelo experimental para estudiar la fertilidad del SX comercial, siendo además predictiva de la fertilidad de la IA *in vivo* (Amann & Gill, 2000; Rodríguez-Martínez, 2003).

Debido al procesamiento durante el sexado del semen, los espermatozoides sufren un mayor daño oxidativo que en el SN, sumado al congelamiento resulta en una disminución de la motilidad e induce la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular espermática. Esto contribuye a una mayor permeabilidad y pérdida de fluidez de la membrana, desactivación enzimática y producción de metabolitos finales tóxicos para los espermatozoides (Thangamani, Srinivas, Chandra Prasad, Anusha & Sadasiva Rao, 2018).

Si bien no es posible evitar el estrés oxidativo, se puede reducir utilizando ciertas sustancias con efecto antioxidante, entre ellas, heparina, cafeína, PTX y MI, que describimos a continuación.

La heparina es un glicosaminoglicano (GAGs), presente en el fluido oviductal que induce en bovinos la capacitación y la reacción acrosómica (Numabe, Oikawa, Kikuchi, & Horiuchi, 2001), prerequisite para la normal fecundación. A su vez, se ha reportado una potente acción sinérgica cuando la heparina se usa en combinación con Cafeína (Niwa & Ogoda, 1988). La Cafeína pertenece a la familia de las metil-xantinas, es un inhibidor de la fosfodiesterasa, lo cual resulta en un incremento del adenosin monofosfato cíclico (AMPc), afectando el metabolismo celular por aumento en la permeabilidad al calcio, incrementándolo significativamente a nivel intracitoplasmático, ayudando a mantener la respiración celular en los espermatozoides bovinos (Garbers, First, Sullivan & Lardy, 1971), aumentando notoriamente la motilidad espermática y estimulando la capacitación y reacción acrosómica (Boni, Gallo & Cecchini, 2017).

Ambas sustancias en conjunto, han sido estudiadas y está comprobado que su uso mejora la capacitación del semen congelado-descongelado y la fertilidad *in vitro* del semen en bovinos, así como el desarrollo embrionario en FIV, demostrado por Ogoda, Niwa, Yuhara, Takahashi & Kanoya (1987), Parck, Ohgoda & Niwa (1989), Numabe *et al.*, (2001). Por lo tanto, su uso es de rutina en los protocolos de capacitación espermática llevados a cabo en el laboratorio.

La PTX es una metil-xantina [7-dimetil-1-(5-oxo-hexil)-xantina], activador de la motilidad espermática pues es un inhibidor de la metilxantin-fosfodiesterasa, y además inhibe la generación de anión superóxido en su función como antioxidante (Zhang *et al.*, 2014). Inhibe el factor necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), responsable de la fragmentación del ADN y la consiguiente apoptosis celular (Barakat, Danfour, Galewan & Dkhil, 2015). También se ha demostrado que reduce la peroxidación de los lípidos de la membrana y previene los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Zhang, Sharma, Agarwal & Falcone, 2005).

El MI es un azúcar cíclico, perteneciente al grupo del complejo B (vitamina B7). El Inositol mejora la morfología y actividad mitocondrial, y presenta acción antioxidante. El MI se ha propuesto como activador de la motilidad espermática dada la importancia que tienen las mitocondrias en la función espermática, a la vez que incrementa el potencial de membrana (Colone *et al.*, 2010; Condorelli, La Vignera, Bellanca, Vicari & Calogero, 2012). También está implicado en señales celulares dependientes del calcio y es un activador metabólico (Boni *et al.*, 2017). A pesar de estos efectos, no ha sido suficientemente estudiado como para obtener datos fehacientes en su uso previo a la FIV.

La fertilidad del SX es generalmente menor, siendo la dosis inseminante 12 a 16% de una dosis convencional (Zhang *et al.*, 2014), por tanto, la aplicación de técnicas o procedimientos que mejoren la motilidad y longevidad del SX congelado-descongelado podrían mejorar los resultados en IA y FIV.

Lo antes expuesto, nos conduce a proponer el estudio de la PTX y el MI como promotores de la motilidad en SX de toro para incrementar la fertilidad del mismo.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 DATOS NACIONALES Y MERCADOS

Con un stock actual de 11.827.144 cabezas de ganado de carne y 707.529 cabezas de ganado de razas lecheras (Sistema Nacional de Información Ganadera, SNIG, 2021), Uruguay está evolucionando hacia la eficiencia en su producción, una manera que tienen los productores de obtener un mejor resultado económico para sobrellevar los costos de producción.

Dichos cambios se pueden ver al disminuir la cantidad de animales en categorías ineficientes como ser los novillos de más de 3 años (Datos actualizados basados en la Declaración Jurada de Existencias DICOSE – SNIG, 2021), lo que se traduce en seleccionar hacia la precocidad logrando mayores pesos en novillos jóvenes.

Los cambios en stock variarán de acuerdo al clima, es de esperar que años en los que se presenta sequía en pleno entore (primavera tardía/verano, en nuestras latitudes), aumente el número de vacas de invernada y disminuya el número de nacimientos en la siguiente campaña.

Un rubro que sigue en caída libre desde hace varios años es el lechero (una reducción del stock en 3,6% en la última declaración jurada) (Datos actualizados basados en la Declaración Jurada de Existencias DICOSE – SNIG, 2021), donde muchos productores optan por enviar a faena sus vacas cuando los precios son relativamente altos, o directamente liquidan la empresa. El sistema debe de estar muy optimizado como para que apenas genere ganancias, por otro lado, hay poca diversificación del rubro.

Otro de los inconvenientes que presenta esta cadena productiva es el nacimiento de terneros. Su crianza, genera un flujo importante de dinero hacia ese destino que termina perjudicando la cría/recría de hembras y el resultado económico final, por lo que algunos productores optan por el sacrificio al nacimiento de los mismos (Bruno *et al.*, 2009). Otros tantos, realizan la venta post calostrado y en un muy bajo porcentaje

realizan la cría con menos de los requerimientos que necesita el animal; aquí será importante, entonces, la producción de hembras y es donde el SX toma relevancia.

En 2020 y luego de 5 años, se retomó el mercado para la exportación de hembras bovinas de razas lecheras con destino a China (Uruguay concretó la venta de 7.000 cabezas de ganado en pie a China, tras cinco años sin exportación, 2020), dicho negocio representó un 12,3% de las exportaciones de bovinos en pie en el último año (INAC, 2022). Es una opción muy favorable que tienen los productores para vender parte de la producción de hembras a relativamente buen precio, si lo comparamos con el logro en el mercado interno (García Pintos, 2021).

No obstante, para los productores de ganado de carne que presentan un mayor número de opciones comerciales, desde el 2020 tuvo un alto crecimiento (14,6% a 41,3% en 2021) el mercado para la exportación de hembras bovinas con destino a reproducción principalmente a China, anteriormente la operativa era con mayor énfasis en terneros machos con destino a Turquía, mercado que va en detrimento en los dos últimos años (85,4% en 2020 a 58,7% en 2021) (INAC, 2022).

Con lo descrito anteriormente y con la alta suba de los precios de faena todo podría indicar que el stock bovino tendería a caer fuertemente, sin embargo, es cada vez mayor la adopción de tecnologías de manejo por parte de los productores para tratar de preñar el mayor número de vientres posibles. Entre estas técnicas se pueden mencionar el destete temporario, precoz, hiperprecoz, revisión de toros y sobre los vientres, diagnóstico de actividad ovárica, inseminación artificial a tiempo fijo, entre otras (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA 2021).

4.2 SEMEN SEXADO

Su historia dista de mucho tiempo atrás, desde 1981 surgen los primeros registros acerca de la posibilidad de medir la diferencia entre los espermatozoides que producían hembras de machos mediante el ADN. Los primeros intentos no lograron obtener espermatozoides motiles debido a que la tinción utilizada para el citómetro causaba daños en las células, pero fueron el puntapié para el desarrollo de técnicas más efectivas (Garner & Seidel, 2008).

En 1989 se logran las primeras inseminaciones quirúrgicas en oviducto de coneja con SX de la misma especie, las limitaciones siempre fueron el bajo número de espermatozoides obtenidos y el tiempo de clasificación; posteriormente se comienza a utilizar en FIV. Hasta el momento solo se trabajaba con semen fresco o refrigerado. En 1994 se prueban las primeras inseminaciones con SN refrigerado a baja dosis (10000 esp totales), datos que fueron alentadores para realizar las mismas pruebas con SX en 1995 (Garner & Seidel, 2008).

Schenk, Suh, Cran & Seidel, (1999) logran criopreservar las primeras muestras de SX, gran avance en lo que fue el traslado de semen a diferentes partes de EEUU, y posteriormente facilitó su comercialización.

Desde el 2006 se llevan cifras de inseminaciones en Estados Unidos con SX, país pionero en la técnica, de la cuales se despliega que su uso en vaquillonas Holando

representaba el 9,2% de las inseminaciones y 2,4% en vacas, con valores crecientes (Hutchison & Norman, 2009). El mayor uso en la primera categoría es debido a porcentaje de preñez más altos atribuibles a las menores exigencias productivas, que redundan en mayor fertilidad.

4.3 MÉTODOS DE SEXADO

4.3.1 CITOMETRÍA DE FLUJO

Es una herramienta utilizada para diferentes fines en el campo de la medicina, microbiología y bioquímica. La tecnología permite analizar células, núcleos, cromosomas y mitocondrias, entre otros, de manera rápida, objetiva y cuantitativa. El término citometría hace referencia a aquellas tecnologías que poseen la capacidad de realizar medición, recuento, comparación, y otras caracterizaciones de células (Izquierdo *et al.*, 2016). Inicialmente, esta era utilizada con el fin de analizar células sanguíneas, y al correr de los años fue aplicándose en diferentes áreas, pasando a ser una técnica apreciada.

A partir de 1980, la técnica de citometría de flujo comenzó a ser utilizada en la veterinaria para el sexado de espermatozoides, esto se refiere a la obtención de muestras de semen con un elevado porcentaje de cromosomas únicamente del sexo deseado. Esto se debe a la capacidad que tiene la técnica de diferenciar espermatozoides X e Y, según su contenido de ADN, siendo mayor (cerca de 3,9%) el contenido de ADN del cromosoma X en la mayoría de los mamíferos (Oses, Teruel & Cabodevila, 2009). Según Villanueva & Mellisho (2011), el contenido de ADN de los espermatozoides de bovino posee una diferencia aproximada de 3,7% del X por encima del Y; a su vez, Garner & Seidel Jr (2008), indican cierta variación en la diferencia de contenido ADN dentro de la especie bovina según la raza.

Seidel Jr. *et al.*, (1999) con el citómetro de flujo MoFlo® lograron una precisión cercana al 90% de bovinos del sexo deseado, además, aquellos animales obtenidos por SX no parecían presentar mayores anomalías que los nacidos de SN.

Para esta tecnología el semen es teñido con colorante Hoechst 33342, tinción para células vivas que penetra la membrana celular y se une de forma específica al ADN de los espermatozoides, y al ser sometidos a luz láser van a emitir fluorescencia. Como se explicó anteriormente, los espermatozoides X tienen mayor cantidad de ADN, a causa de esto, van a emitir mayor fluorescencia que los espermatozoides Y. La fluorescencia que va emitir cada espermatozoide una vez teñido, es procesada por un software, por medio de un circuito que permite alinear e identificar los espermatozoides individualmente, permitiendo la clasificación de la población espermática de interés, ya sea X o Y; que serán cargados eléctricamente y desviados por un campo magnético del flujo original para finalmente, ser recolectados (Oses *et al.*, 2009; Izquierdo *et al.*, 2016; Ródenas, Riera & Arjona, 2020).

Salinas (2016), menciona que de todos los espermatozoides sometidos al proceso de sexaje, solo un 40% termina siendo colectado, donde un 20% corresponde a la fracción X y el otro 20% a la fracción Y. El resto de los espermatozoides (60%) representa a espermatozoides muertos o a aquellos que no pudieron ser detectados por la técnica.

Estudios realizados por Oses *et al.*, (2009), muestran que los resultados de preñez en IA con SX a celo visto son entre 5% y 35% inferiores a los obtenidos con SN. En el caso de transferencia embrionaria (TE) y FIV, los resultados del SX generalmente son también inferiores a los obtenidos con SN. Esto se puede relacionar, a lo que Salinas (2016) explica como daños que sufren los espermatozoides simplemente por el procesamiento durante el sexaje, aun cuando estos no presentan tinción o no han sido expuestos al láser; sumado a la menor concentración espermática del SX respecto al convencional: 2.1 millones de espermatozoides por dosis y 15 a 20 millones de espermatozoides por dosis respectivamente (Villanueva & Mellisho, 2011).

4.3.2 SEXCEL

Reciente tecnología utilizada para el sexado de semen bovino, que se basa en la tinción de los espermatozoides según su contenido de ADN y posterior destrucción mediante láser de aquellos espermatozoides del sexo no deseado, quedando los gametos destruidos en la pajuela sin alterar las tasas de concepción (Faust, Betthausen, Storch & Crego, 2016). En la actualidad se encuentra disponible SX por Sexcel para las razas Holstein, Jersey, Norwegian Red, Milking Gyr, Girolando y Nelore (ABS Global Uruguay, 2020).

Al evaluar esta tecnología se supo que sobre los espermatozoides vivos el 87,2% en promedio eran portadores de X; y la proporción de terneras nacidas fue cercano al 84,6% (Faust, Betthausen, Crego *et al.*, 2016). Mientras que para el SX con la tecnología de citometría de flujo, se evidencia la obtención de semen con un contenido superior al 90% de espermatozoides del sexo deseado (Urbina, 2012).

Si bien el SN logra mejor tasa de concepción que el semen tratado con Sexcel (78% en SX sobre SN) la diferencia se hace menor si solo se inseminan hembras que muestran celo en trabajos de inseminación a tiempo fijo (Perry *et al.*, 2020).

4.4 CASA

Los sistemas computarizados de análisis de semen (CASA, por sus siglas en inglés) son utilizados en los principales centros de reproducción con el fin de garantizar de forma óptima, rápida y fiable la calidad de sus productos. Con el uso de esta tecnología se quitó la subjetividad propia de cada operador mediante el uso de la tradicional microscopía. Dicho sistema permite procesar múltiples muestras en poco tiempo, y obtener ciertos parámetros correlacionados con la capacidad fecundante de los espermatozoides, evaluando la población espermática en una muestra de semen, como cada espermatozoide de forma individual (Valverde & Madrigal, 2018).

El sistema trabaja mediante una cámara de video de alta resolución (no menos de 768x576), y de velocidades de captura de sesenta imágenes por segundo (fps, frame per second, por sus siglas en inglés) (Castellini, Dal Bosco, Ruggeri & Collodel, 2011) y contraste de fase negativo considerando las particularidades de los espermatozoides de algunas especies.

En cuanto a la información que el sistema nos arroja, tenemos los de cinética como

la Velocidad Curvilínea (VCL), Velocidad Rectilínea (VSL) y Velocidad Promedio (VAP), Linealidad (LIN), Rectitud del Movimiento (STR) y Balanceo Espermático (WOB), Desplazamiento Lateral de la cabeza espermática (ALH), entre otros; y morfología (cabeza, cuello y cola espermática), que nos permitirá saber el estado fisiológico o patológico de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias (Valverde & Madrigal, 2018).

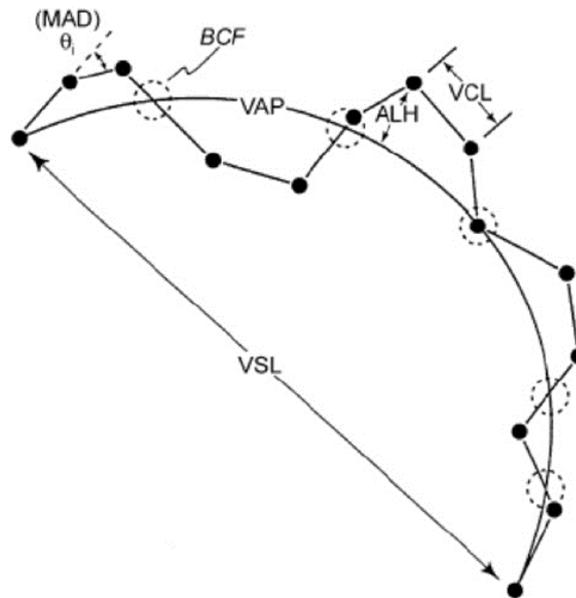


Figura 1- Representación esquemática de algunos de los patrones de motilidad medidos por CASA. Los círculos negros representan imágenes sucesivas (centroides) de la cabeza de un espermatozoide móvil. Valverde & Madrigal (2018).

MAD: desplazamiento angular medio, BCF: frecuencia de cruzamientos, VAP: velocidad de trayectoria media, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad de línea recta

En el proceso de captura se toma un fotograma que proporciona el centroide de un espermatozoide y en las imágenes sucesivas se deducirá su localización más probable, de esta manera se obtiene el cálculo de los diferentes parámetros. La velocidad promediada a través de esa trayectoria se denomina velocidad de trayectoria media (VAP, $\mu\text{m/s}$); trazando una línea recta entre el primer centriolo y el último obtendremos la velocidad en línea recta (VSL, $\mu\text{m/s}$); la velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) será la calculada mediante la unión de las coordenadas del centroide del espermatozoide en cada una de las imágenes analizadas; a la desviación de la posición del centroide de su trayectoria media se le llamará amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm). De manera similar, hay puntos en los que la trayectoria curvilínea intercepta la trayectoria promedio, y el número de tales intersecciones se denomina frecuencia de cruzamientos (BCF, Hz) (Valverde & Madrigal, 2018).

A partir de las tres primeras trayectorias se calculan tres índices, la linealidad ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$), la rectitud ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$) y la oscilación ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL}$) de las

trayectorias, con lo que queda caracterizada la calidad del movimiento espermático (Valverde & Madrigal, 2018).

Algunas de estas variables antes descritas se han utilizado para determinar la fertilidad de los toros (Farrell, Presicce, Brockett & Foote, 1998) y búfalos en temporada reproductiva baja y alta (Ahmed, Andrabi & Jahan, 2016; Ahmed, Andrabi, Anwar & Jahan, 2017), encontrando correlaciones para motilidad progresiva (MP), velocidad rápida, VAP, VSL, STR (0,34-0,81; 0,57-0,85; 0,52-0,64; 0,56-0,73; 0,57 respectivamente). Además Farrell *et al.*, (1998), plantea la evaluación de mediciones en conjunto como predictores de la fertilidad, obteniendo lo siguiente (Figura 2).

Figura 2: Correlación entre las variables y fertilidad de toros.

Correlacion entre las variables y fertilidad de toros*

Variables	Correlacion (r2)**1
ALH MP	0,68
VCL MP	0,67
VAP MP	0,63
VSL MP	0,63
ALH BCF MP	0,83
BCF VCL MP	0,82
BCF VSL MP	0,75
BCF VAP MP	0,74
BCF LIN VAP VSL	0,95
ALH BCF VSL MP	0,89
ALH BCF VAP MP	0,87
ALH BCF VCL MP	0,87
ALH BCF LIN VAP VSL	0,98
BCF LIN VSL VCL STR	0,97
BCF LIN VAP VSL STR	0,97
BCF LIN VAP VSL VCL	0,97

*Adaptada de Farrel et al., 1998

**1 p<0,05

No obstante, Moreno, Mayorga Torres & Maya (2016) plantean que el análisis de semen debe de ser más integral, para poder predecir con mayor efectividad la fertilidad de los toros. Por tanto, a las variables estudiadas por CASA se le suma el estudio de viabilidad espermática.

Sun *et al.*, (2021), plantea una clasificación de toros de acuerdo a la fertilidad según los datos obtenidos mediante inseminación artificial y fertilización *in vitro* en grado 1 (fertilidad normal) con una tasa de concepción de IA del 40%±5% y una tasa de FIV del 45% al 60%; grado 2 (fertilidad alta) con una tasa de concepción de IA del 50% ±5% y una tasa de FIV del 61% al 80%; y grado 3 (fertilidad muy alta) con una tasa de concepción de IA del 60%±5% y una tasa de FIV de >80%.

4.5 PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

La industria de la TE en bovinos fue establecida en Estados Unidos a inicios de los años 70 (Salgado & Lopera, 2020) cuando las razas europeas de doble propósito se hicieron populares en América del Norte, Australia y Nueva Zelanda. Los criadores

buscaron medios para eludir los altos costos y los largos períodos de cuarentena vinculados a la importación de reproductores europeos y para capitalizar los precios superiores de la progenie (Seidel Jr. & Seidel, 1991).

La primera transferencia de un embrión bovino se informó en 1949 (Umbaugh, 1949), y el primer ternero de la TE en 1951 (Willett *et al.*, 1951).

La obtención de los gametos femeninos es por técnicas laparoscópicas o técnicas guiadas por ultrasonografía (OPU-por sus siglas en inglés), así como de estructuras de animales procedentes de mataderos. Todas estas técnicas tendrán como fin común la extracción del contenido de los folículos y la obtención de gametos inmaduros (complejos cumulus-ovocito (COC)) (Ferré *et al.*, 2020; Salgado & Lopera 2020).

La producción *in vitro* de embriones puede dividirse en tres pasos esenciales: a) Maduración *in vitro*, b) Fertilización *in vitro*, y c) Cultivo *in vitro*.

Es esencial la calidad de los ovocitos recolectados en la eficiencia de la maduración *in vitro*. La calidad está relacionada desde su recolección por la cantidad y calidad de las células del cumulus adyacentes, así como por la calidad de su citoplasma (homogeneidad y coloración -color café- principalmente, otros colores se asocian a grados de degeneración) (Salgado & Lopera, 2020).

a) La maduración *in vitro* es el proceso contiguo a la extracción de los COC, los gametos femeninos logran desarrollarse, adquiriendo la competencia citoplasmática y genética para ser fecundados. Esto se hace debido a que los óvulos recolectados proceden de folículos de poco desarrollo, con tamaños entre 2 y 8 mm. La eficacia dependerá del método y tiempo de recolección de los COC, la temperatura del transporte, su estadio de desarrollo (óvulos ya maduros afectan el rendimiento del lote), además tendremos factores dependientes del operador como ser el tiempo de maduración (22-24 horas) y composición del medio de maduración (osmolaridad, pH) (Salgado & Lopera, 2020).

b) Fertilización *in vitro*: proceso que le continúa al de maduración, los COC se co-incuban con espermatozoides por 18-24 horas (Ferré *et al.*, 2020). Los principales eventos que ocurren en este periodo son la capacitación y penetración de los espermatozoides, la unión de los gametos y la formación de los pronúcleos (Salgado & Lopera, 2020).

El proceso de capacitación espermática favorece cambios estructurales y bioquímicos en el espermatozoide, que conducen la eliminación de componentes adheridos a la membrana del espermatozoide, cambio de la composición lipídica de la membrana espermática, aumento de la permeabilidad a los iones Ca²⁺, cambio en el pH interno y un incremento en la permeabilidad y metabolismo celular para lograr una correcta penetración y fusión al ovocito (reacción acrosómica). Para esto se utilizó el medio desarrollado por Brackett & Oliphant en 1975, este tiene como fundamento que, mediante la exposición de los espermatozoides a un medio hipertónico ocurre la remoción de elementos proteicos de origen epididimal y seminal, ligados a la superficie de los espermatozoides que evitan la fecundación (Benavides, 2008).

A este último mencionado, se le añaden sustancias tales como albúmina sérica

bovina, heparina (considerada de gran importancia en la capacitación espermática, se une a la membrana mediante proteínas del plasma seminal, reduciendo la actividad del calcioATPasa, permitiendo la entrada de calcio extracelular), aminoácidos (permiten mantener una buena motilidad espermática e incrementar las tasas de penetración del ovocito), y la cafeína que favorece la hipermotilidad espermática, y presenta efecto sinérgico con la heparina, entre otros (Salgado & Lopera, 2020).

Tras la descongelación de la pajuela de semen, previo a capacitación, se puede optar por utilizar técnicas de selección espermática: de migración (Swim-Up), y las de lavado selectivo de subpoblaciones a través de centrifugación de gradientes de densidad como el Percoll(r) y el Bovipure(r), entre otras, para finalmente ajustar la concentración de espermatozoides (1×10^6 spz/ml de medio de fecundación), adicionar los ovocitos a las gotas ya formadas y que se genere la fertilización propiamente dicha. El cocultivo será por 18-24 horas (Salgado & Lopera, 2020).

La tasa de fertilización, medida a las 48 horas después de la inseminación (clivaje) generalmente oscila entre el 70% y el 85% (Ferré *et al.*, 2020).

c) El cultivo *in vitro* embrionario se puede definir como el periodo en el cual se desarrollan las estructuras desde presuntos cigotos hasta mórulas compactas o blastocistos (formas transferibles). Este periodo está comprendido entre el día 1 y el día 7 del desarrollo embrionario. Es posterior al proceso de fertilización, los presuntos cigotos se retiran del medio de la fertilización, se extraen las células de cumulus adyacentes a los presuntos cigotos por medio de pipeteo o vortex, y luego de clasificados, los de mejor calidad pasaran al medio de cultivo (Salgado & Lopera, 2020).

La valoración del desarrollo y la calidad embrionaria se realizarán a partir de las primeras 24 horas de puestos en el medio de cultivo o 48 horas post fertilización. En este punto se evaluará el clivaje, pudiendo encontrar estadios de 2-4 o más células. Posteriormente, al día 7 se encontrarán distintos estadios de mórulas y blastocistos. La calidad de estos últimos será bajo los estándares y normas IETS, entre los aspectos más relevantes que se apreciará estarán la simetría, homogeneidad y la coloración de la estructura del embrión, al igual que la coincidencia con el tiempo de desarrollo (Seidel & Seidel, 1991; Salgado & Lopera, 2020).

Cerca del 80% puede llegar el estadio de dos células y entre 30-40% alcanza el estado blastocisto a los 7 días luego de la fertilización (Ferre *et al.*, 2020).

4.6 ESTRÉS OXIDATIVO

Si bien el oxígeno es una molécula imprescindible para la vida (organismos aerobios), al poseer una elevada reactividad puede ser un elemento tóxico; el organismo mantiene un balance de óxido-reducción constante, pero cuando esto no se puede sostener, existe un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes, generándose lo que se conoce como estrés oxidativo (Lizarraga, Galarza, Ventura & Mattioli, 2015).

La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud. Puede darse un estrés oxidativo leve, donde las defensas antioxidantes van a tener la capacidad de restablecer el balance; pero también puede

darse un estrés oxidativo grave generando importantes alteraciones en el metabolismo celular. Además, el daño por dicho estrés, puede llegar a ser reversible o irreversible, esto va a depender de diferentes factores, como lo son el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes (Martínez, Vargas & Arancibia, 2003).

Según las circunstancias de las uniones del oxígeno (reducción), se pueden formar diferentes ERO; los más importantes son: el anión superóxido y el radical hidroxilo (verdaderos radicales), el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el oxígeno singlete; y su formación es inevitable, ya que surgen como consecuencia del procesamiento metabólico de la materia orgánica, teniendo relación con la tasa metabólica. Por lo tanto, ante situaciones de estrés oxidativo, hay formación de radicales libres (sustancias químicas con electrones libres o impares) que tienen la capacidad de generar múltiples daños a nivel celular por su alta nocividad (Viada Pupo, Gómez Robles & Campaña Marrero, 2017).

Los radicales libres son agresivos debido a que, en su órbita externa (donde se dan las reacciones químicas) existen electrones solitarios con la tendencia de aparearse con otro electrón. Estas especies, debido a su atracción paramagnética, tienen el comportamiento de misiles biológicos con la capacidad de agresión indiscriminada sobre células (González-Urbaneja, 2006).

La formación de radicales libres sucede a pesar de existir sistemas antioxidantes para el control. Estas son sustancias con la capacidad de inhibir la oxidación generada por los radicales libres, e incluyen dos mecanismos: uno endógeno, también llamado enzimático; y otro de origen exógeno, conocido como no enzimático (Viada *et al.*, 2017).

El mecanismo enzimático se basa en convertir las ERO en compuestos no reactivos; mientras que, el mecanismo no enzimático actúa por medio de compuestos antioxidantes que se oxidan a sí mismo para evitar que se dañen otros componentes celulares (Lizarraga, *et al.*, 2015). La acción y por ende la protección que va a generar un antioxidante va a depender, entre otras cosas, de su concentración, reactividad hacia la ERO y el estado de los antioxidantes con los que actúa.

Las enzimas antioxidantes son proteínas unidas a minerales esenciales, por lo que para su correcto funcionamiento no solo se requiere una adecuada síntesis de proteínas, sino también es fundamental la oferta de minerales. Dentro de estas enzimas están las superóxidodismutasas, dependiente de manganeso o de cobre y zinc; la ceruloplasmina, también dependiente de cobre; y glutatión peroxidasa, dependiente de selenio. Los principales antioxidantes no enzimáticos son las vitaminas liposolubles, destacándose la vitamina E, que se ubica dentro de las membranas celulares, y se sacrifica para ser oxidada en lugar de otros compuestos celulares (Lizarraga *et al.*, 2015).

4.7 MIOINOSITOL

El MI es uno de los 9 cicloisómeros de hexanohecol, está presente en altas concentraciones en la leche de todos los mamíferos (Downes, 1989). Puede ser

sintetizado por células eucariotas a partir de glucosa (síntesis de novo) en una reacción de óxido/reducción catalizada por la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Soltani, Kafilzadeh & Shabankareh, 2012). Es transportado a la célula mediante difusión pasiva por transportadores de baja afinidad o de lo contrario de forma activa mediante la bomba de sodio (Chiu *et al.*, 2002). Varios estudios han apuntado al beneficio en su uso en técnicas de reproducción asistida (TRA). Se observó que en mujeres, la adición de MI mejoró el crecimiento y desarrollo embrionario (Chiu & Tam, 1992), aumentó el porcentaje de formas embrionarias tempranas (Soltani *et al.*, 2012) y el número de ovocitos y embriones de buena calidad, atribuible a su efecto antioxidante (Vitale *et al.*, 2016). Fisiológicamente, actúa como un segundo mensajero de la hormona folículo estimulante (FSH) y está involucrado en las vías mediadas por FSH que regulan la proliferación y maduración de las células de la granulosa mediante la modulación en la producción de hormona anti-mulleriana (AMH), desempeña un papel fundamental en la determinación de la maduración y el transporte de ovocitos de óptima calidad en el oviducto (Dinicola *et al.*, 2021).

Sobre los espermatozoides el MI se comporta como segundo mensajero modulando los niveles de calcio intracelular, de esta manera regula el metabolismo oxidativo mitocondrial y la producción de ATP, claves en la motilidad, reacción acrosómica y fecundación (Dinicola *et al.*, 2021).

Se utilizó con éxito para tratar a los hombres con disfunción de la fertilidad, especialmente oligoasthenoteratozoospermia (OAT), donde se evidencia aumento en la motilidad progresiva relacionado al aumento de la actividad mitocondrial (Condorelli *et al.*, 2012; Dinicola *et al.*, 2021). En caprinos (Limongi, Farias, Rique, Silva-Neto & Silva, 2018), equinos (Affonso *et al.*, 2017) y carneros (Kulaksiz *et al.*, 2011) no hubo efecto sobre la motilidad espermática, ni en su función como antioxidante, resultando perjudicial a dosis de 30 mM para las células espermáticas con una reducción en la motilidad a las 2 horas pos-descongelación e incubación.

4.8 PENTOXIFILINA

Pertenece a la familia de las metilxantinas, es derivada de la teobromina y fue sintetizada en el año 1963 (González, 2007). Esta tiene la capacidad de aumentar las concentraciones intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), por ser inhibidora de la fosfodiesterasa (Duarte Jr *et al.*, 2016). Inhibe el factor necrosis-tumoral-alfa (TNF-alfa), responsable de la fragmentación del ADN y consiguiente apoptosis celular (Barakat *et al.*, 2015). En su función como antioxidante reduce la peroxidación de los lípidos de la membrana y previene los efectos tóxicos de las ERO (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014).

También se ha visto un incremento en la fosforilación de la tirosina a nivel del flagelo (Zhang *et al.*, 2014); en espermatozoides, la fosforilación de la tirosina es un importante regulador en el camino de la modulación de eventos asociados con la capacitación. El aumento de la fosforilación de tirosina durante la capacitación es regulado por la proteína kinasa A (PKA), la cual es activada por AMPc (Naz & Rajesh, 2004). Petrunkina, Simon, Günzel Apel & Töpfer Petersen (2003) relacionan el

incremento de la fosforilación de la tirosina con la adquisición de hipermotilidad, fenómeno que se da en la hiperactivación espermática durante el periodo de capacitación. Todo esto contribuye al incremento de la motilidad espermática inducido por la PTX y a la mejora de la fertilización (Numabe, 2001; Henkel & Schill, 2003). Numerosos trabajos estudiando la adición de PTX en semen, indican un efecto positivo sobre aquellos espermatozoides de baja calidad y con alteración en su motilidad (Negri, Grechi, Tomasi, Fabbri & Capuzzo, 1996; Fernández Abella, Guérin, Sterla, Irabuena & Dacheux, 2006; Zúñiga Morales, 2015). Además permite prolongar la viabilidad del mismo (Aparicio, Schwarzstein & de Turner, 1980; Vega, Wilde & Cruz, 1997; Zhang *et al.*, 2014).

5. HIPÓTESIS

La pentoxifilina y el mioinositol mejoran la motilidad, cinética, termorresistencia y fertilidad *in vitro* del semen bovino sexado y no sexado previamente capacitado.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tratamiento con pentoxifilina y mioinositol, sobre los parámetros de motilidad, cinética y fertilidad *in vitro* del semen bovino sexado y no sexado, descongelado y capacitado.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar el efecto del tratamiento con pentoxifilina o mioinositol al descongelado, previo a la capacitación con cafeína y heparina, sobre los parámetros de motilidad y cinética del semen sexado y no sexado.
- 2) Evaluar el efecto del tratamiento con pentoxifilina o mioinositol al descongelado y previo a la capacitación con cafeína y heparina, sobre la termorresistencia a las 2 horas del semen sexado y no sexado.
- 3) Determinar el efecto del tratamiento con pentoxifilina o mioinositol, previo a la capacitación con cafeína y heparina, sobre la fertilidad *in vitro* del semen sexado y no sexado y sobre el desarrollo embrionario.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Para todos los experimentos que se describen a continuación se utilizó SX y SN de una misma partida seminal del mismo toro.

Se realizaron 2 experimentos.

7.1 Experimento 1

Se evaluó el efecto de la PTX y el MI sobre los parámetros de motilidad y cinética, entendiendo por motilidad al análisis genérico, mientras que cinética refiere al estudio pormenorizado de las características del movimiento de los espermatozoides (Valverde *et al.*, 2018).

Los estudios de motilidad y cinética espermática se realizaron en el Sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Se utilizó el equipo AndroVision® Minitüb GmbH, Tiefenbach (Alemania), existente en la estación experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) en la ciudad de Paysandú, Uruguay, seteado para bovinos (inmóviles: BCF<3; motiles locales: VCL<25 µm/s; considerando progresivos a la suma de circulares, lentos y rápidos; circulares: radio >10<50, lentos: VCL<35 µm/s y rápidos: VCL>35 µm/s). Se estudiaron los parámetros de motilidad general y progresiva, velocidad y recorrido de la trayectoria circular, trayectoria recta y promedio, linealidad, índice de oscilación e índice de hiperactivación. Los estudios se hicieron luego de los tratamientos correspondientes que se explican a continuación. Luego se incubaron los grupos durante 2 horas y se volvieron a evaluar mediante el sistema CASA para comprobar la termorresistencia de cada grupo.

Las muestras descongeladas se pre trataron con los antioxidantes mencionados según los grupos experimentales, SN-C, SN-PTX y SN-MI, SX-C, SX-PTX, SX-MI.

Las concentraciones y tiempos utilizados se basan en investigaciones previas (Vega *et al.*, 1997; Parrish, 2014; Boni *et al.*, 2017).

El semen se incubó en Tissue culture medium modificado (mTCM-199, Sigma-Aldrich, EEUU) un medio definido, con agregado de suero fetal bovino (SFb), antibióticos (Vega *et al.*, 1997), suplementado con Hepes (Vega *et al.*, 1997) y adicionando o no con PTX o MI de acuerdo a los grupos descritos:

SN-C: se incubó el SN durante 30 min. en mTCM-199.

SN-PTX: se incubó el SN durante 30 min. en mTCM-199 adicionado con PTX, 6 mM.

SN-MI: se incubó el SN durante 30 min. en mTCM-199 adicionado con MI, 0,72 M.

SX-C: se incubó el SX durante 30 min. en mTCM-199.

SX-PTX: se incubó el SX durante 30 min. en mTCM-199 adicionado con PTX, 6 mM.

SX-MI: se incubó el SX durante 30 min. en mTCM-199 adicionado con MI, 0,72 M.

Tras la incubación se procedió a evaluar cada grupo pretratado con el sistema CASA.

Los grupos experimentales se centrifugaron para su capacitación en medio Brackett & Oliphant (1975) (BO) con cafeína (C4144, Sigma-Aldrich, EEUU) (10 mM) y heparina (H3149, Sigma-Aldrich, EEUU) (10 mg/mL), seguido de lavado y dilución en medio BO de fertilización y posterior evaluación con CASA. Los grupos se incubaron durante 2 horas para evaluar la termorresistencia, volviéndose a evaluar con CASA al culminar este período.

En total se evaluaron con CASA 3 veces cada grupo (tras el pretratamiento, luego de la capacitación y luego de la incubación durante 2 horas (termorresistencia)).

Tabla 1 Cronología de trabajo:

Grupo	Tratamiento	CASA	Capacitación *	CASA	2 h de incubación	CASA
SN-C	SN + mTCM-199, 30 min	Si	BO	Si	Si	Si
SN-PTX	SN + PTX mTCM-199, 30 min.	Si	BO	Si	Si	Si
SN-MI	SN + MI mTCM-199, 30 min.	Si	BO	Si	Si	Si
SX-C	SX + mTCM-199, 30 min	Si	BO	Si	Si	Si
SX-PTX	SX + PTX mTCM-199, 30 min.	Si	BO	Si	Si	Si
SX-MI	SX + MI mTCM-199, 30 min.	Si	BO	Si	Si	Si

* Con cafeína y heparina

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Número total y concentración espermática de la muestra [$10^6/\text{mL}$],
- Motilidad total y progresiva [%],
- Motilidad rápida, lenta, circular y total [%],
- Espermatozoides Inmóviles [%],
- Velocidad curvilínea (VCL) [$\mu\text{m/s}$],
- Velocidad de la línea recta (VSL) [$\mu\text{m/s}$],
- Velocidad de la trayectoria media (VAP) [$\mu\text{m/s}$],
- Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) [μm],
- Frecuencia de cruzamientos (BCF) [Hz],
- Oscilación (WOB, VAP/VCL),
- Rectitud (STR, VSL/VAP),
- Índice de hiperactivación (HAC).

Se seleccionaron los datos de VCL, VAP, STR, BCF, WOB, por ser los más relevantes para la fertilización (Larsen *et al.*,2000) y HAC por ser relevante para hiperactivación. Los datos fueron analizados mediante ANOVA, aquellos que

arrojaron diferencias fueron evaluados mediante test de Student, ambos con un nivel de significación del 5%.

7.2 Experimento 2

Realizamos pruebas de FIV con el semen tratado y no tratado de acuerdo a los grupos experimentales ya descritos.

Se obtuvieron 561 complejos ovocito cúmulus (COC) de ovarios bovinos provenientes de frigoríficos locales de menos de 5 horas de faenados, transportados en solución salina isotónica a 37°C. El contenido de los folículos de 2 a 8 mm de diámetro fue aspirado mediante jeringa con aguja hipodérmica 18G, utilizando medio buffer fosfato salino modificado (m-PBS), con 5 % de suero fetal bovino (SFb) y antibióticos (Penicilina-Estreptomicina).

Se utilizaron los COC, clase A (más de 3 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo según normas de la IETS (Stringfellow & Givens, 2009).

Para la maduración *in vitro*, los COC fueron lavados 2 o 3 veces en cajas de Petri de 35 mm de diámetro con m-PBS y se cultivaron para su maduración en TCM-199 + 5% SFb + Hormonas, en gotas de 100 µl en grupos de 10 COC por gota, cubiertos con aceite mineral, en incubadora (38°C, con 5% de CO₂ y 90-95% de humedad) por 22 horas.

Las pajuelas de semen fueron procesadas e incubadas de acuerdo a los grupos experimentales, de la misma forma que en el experimento 1.

Pasado el tiempo de incubación cada grupo se capacitó por centrifugación en medio BO de lavado de semen (Bracket & Oliphant, 1975), conteniendo cafeína (10 mM) y heparina (10 mg/mL). Posteriormente se aspiró el sobrenadante, y se determinó la concentración del pellet que queda en el fondo del tubo utilizando la cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de 2×10^6 esp/mL con solución BO de dilución de semen.

Para la fecundación *in vitro* los COC fueron divididos en 6 grupos de similar número y fueron inseminados con el semen previamente tratado y capacitado de los distintos grupos (SN-C, SX-C, SN-PTX, SN-MI, SX-PTX y SX-MI). En platina caliente (37°C) se formaron gotas de 100 µl con el semen, se cubrieron con aceite mineral y se colocaron en las gotas los ovocitos madurados, en una relación de 10 COC por gota. Se pusieron en la incubadora (38,5°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad), por un lapso de 18 horas.

El desarrollo *in vitro* se realizó después de la inseminación. Los presuntos cigotos se cultivaron en medio CR1aa + 5% de SFb, en la incubadora, por 7 días. A las 48 horas de incubación se realizó el estudio de la división (clivaje), en el cual se contabilizó la cantidad de cigotos divididos con respecto a la cantidad de COC sometidos a FIV para cada grupo. A los 7 días desde la fecundación se evaluó el desarrollo de los embriones a formas transferibles.

Se analizaron los resultados por el test de Chi cuadrado, con nivel de significación del 5%.

8. RESULTADOS

8.1 Experimento 1: Evaluación CASA

En los parámetros evaluados en incubación del SN se observó una tendencia a disminuir el VAP ($p=0,08$) para el grupo tratado con PTX, el BCF tuvo una disminución significativa ($p<0,05$) para los tratamientos con PTX y MI, que, al compararlos, se pudo comprobar una diferencia a favor del grupo tratado con MI (Tabla 2). Con respecto a la evaluación realizada a las 2 horas, se evidenciaron mayores resultados en VCL, VAP y HAC ($p<0,05$) en el semen tratado con PTX con respecto a los otros grupos experimentales. En esta misma evaluación, WOB mostró un resultado estadísticamente menor respecto a los demás grupos ($P<0,01$) (Tabla 4).

Al comparar el efecto de los diferentes tratamientos sobre el SX, se halló un aumento significativo en VCL y VAP durante la incubación en los grupos tratados con MI y PTX ($p<0,05$) (Tabla 2). Evaluando la termorresistencia, a las 2 horas existió un mayor HAC ($p<0,05$) en el semen tratado con PTX; además se encontró una tendencia a mejorar VCL ($P=0,09$) para el mismo tratamiento (Tabla 4).

Tabla 2: Cinética espermática a la incubación del SN y SX para cada tratamiento.

INCUBACIÓN	VCL [$\mu\text{m/s}$]	VSL [$\mu\text{m/s}$]	VAP [$\mu\text{m/s}$]	BCF [Hz]	STR [VSL/VAP]	WOB [VAP/VCL]	HAC [rad]
SN-C	194,84	112,27	118,51	28,76	0,92	0,6	0,41
SN-PTX	190,74	100,04	107,85(*)	23,14*	0,9	0,56	0,41
SN-MI	195,7	110,1	116,31	27,58*	0,93	0,6	0,43
SX-C	166,4	64,69	81,4	16,19	0,79	0,5	0,41
SX-PTX	213,84*	113,34	126,31*	12,82	0,84	0,57	0,5
SX-MI	192,85*	99,66	114,14*	15,06	0,82	0,58	0,44

* indican diferencias significativas

(*) indica tendencias estadísticas

Tabla 3: Cinética espermática a la capacitación del SN y SX para cada tratamiento.

CAPACITACIÓN	VCL [$\mu\text{m/s}$]	VSL [$\mu\text{m/s}$]	VAP [$\mu\text{m/s}$]	BCF [Hz]	STR [VSL/VAP]	WOB [VAP/VCL]	HAC [rad]
SN-C	196,6	87,97	104,21	21,57	0,79	0,54	0,39
SN-PTX	193,71	107,3	121,54	14,74	0,82	0,64	0,49
SN-MI	171,1	75,66	93,86	18,12	0,74	0,57	0,41
SX-C	190,27	70,99	96,86	13,51	0,64	0,53	0,47
SX-PTX	236,57	74,12	102,35	12,4	0,64	0,42	0,54
SX-MI	219,05	105,42	135,93	13,53	0,74	0,6	0,36

Tabla 4: Cinética espermática a las 2 horas (termorresistencia) del SN y SX para cada tratamiento.

TERMO - RESISTENCIA	VCL [µm/s]	VSL [µm/s]	VAP [µm/s]	BCF [Hz]	STR [VSL/VAP]	WOB [VAP/VCL]	HAC [rad]
SN-C	123,02	75,4	79,47	23,54	0,93	0,64	0,24
SN-PTX	190,39*	107,99	113,73*	23,62	0,93	0,59*	0,38*
SN-MI	128,1	84,08	87,02	23,77	0,95	0,66	0,22
SX-C	164,81	75,09	91,28	14,61	0,77	0,56	0,4
SX-PTX	199,54(*)	83,19	105,52	12,49	0,73	0,56	0,56*
SX-MI	182,12	59,56	85,19	13,26	0,65	0,45	0,36

* Superíndices indican diferencias significativas

(*) indica tendencias estadísticas

Los valores de motilidad progresiva para el SN luego de la incubación fueron de 73,73%, 40,08%, 61,85% con un desvío de 17,1% para el grupo control, y los adicionados con PTX y MI respectivamente (Figura 3).

Tras la capacitación, los valores fueron 15,2%, 10,2%, 7,17%, con un desvío de 4,06%, para el grupo control, y los adicionados con PTX y MI respectivamente; y finalmente, para la termorresistencia medida a las 2 horas de incubación, los valores fueron 32,18%, 32,96%, 47,39%, con un desvío de 8,7%, para los mismos grupos antes mencionados (Figura 3).

Para el SX, los valores de motilidad progresiva durante la incubación fueron de 9,01%, 9,12%, 14,58%, con un desvío de 3,18%, para la capacitación 7,15%, 5,66%, 4,23%, con un desvío de 1,46%, y para la termorresistencia 13,96%, 9,42%, 7,53%, con un desvío de 3,30% para el grupo control, y los adicionados con PTX y MI respectivamente (Figura 4).

Figura 3: Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de SN tras incubación, capacitación y termorresistencia.

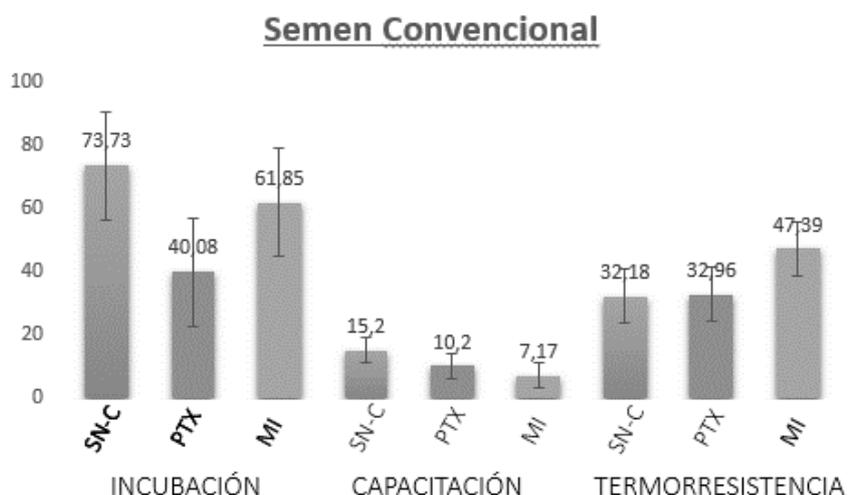


Figura 4: Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de SX tras incubación, capacitación y termorresistencia.

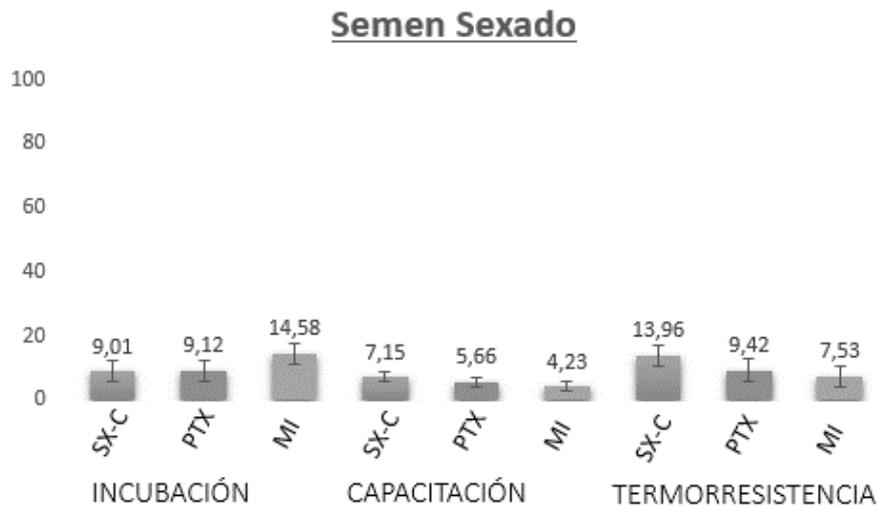


Tabla 5: Porcentaje de espermatozoides progresivos por dosis, concentración espermática y porcentajes de motilidad de las muestras de SN y SX luego de la incubación.

INCUBACIÓN	CE						
	[10 ⁶ mL]	MP [%]	MR [%]	ML [%]	MC [%]	MLoc [%]	EI [%]
SN-C	8,86	73,73	69,8	1,96	1,96	0,39	25,88
SN-PTX	9,85	40,08	34,92	3,57	1,59	1,19	58,73
SN-MI	14,08	61,85	59,63	0,74	1,48	0,74	37,41
SX-C	15,37	9,01	8,43	0,58	0	0,58	90,41
SX-PTX	12,43	9,12	8,18	0,63	0,31	1,89	88,99
SX-MI	10,01	14,58	13,54	0,69	0,35	1,04	84,38

CE: concentración espermática

MP: motilidad progresiva

ML: motilidad lenta

MR: motilidad rápida

MLoc: motilidad local

EI: espermatozoides inmóviles

Tabla 6: Porcentaje de espermatozoides progresivos por dosis, concentración espermática y porcentajes de motilidad de las muestras de SN y SX luego de la capacitación.

CAPACITACIÓN	CE [10⁶/mL]	MP [%]	MR [%]	ML [%]	MC [%]	MLoc [%]	EI [%]
SN-C	8,42	15,2	13,51	0,68	1,01	1,35	83,45
SN-PTX	7,25	10,2	8,63	1,8	0,39	0,39	89,41
SN-MI	10,36	7,17	5,28	1,13	0,75	1,51	91,32
SX-C	26,24	7,15	6,26	0,75	0,15	1,64	91,21
SX-PTX	11,06	5,66	5,66	0	0	0,51	93,83
SX-MI	19,71	4,23	3,7	0,35	0,18	0,18	95,59

CE: concentración espermática

MP: motilidad progresiva

ML: motilidad lenta

MR: motilidad rápida

MLoc: motilidad local

EI: espermatozoides inmóviles

Tabla 7: Porcentaje de espermatozoides progresivos por dosis, concentración espermática y porcentajes de motilidad de las muestras de SN y SX luego de 2hs de incubación a 37°C (termorresistencia).

TERMO – RESISTENCIA	CE [10⁶/mL]	MP [%]	MR [%]	ML [%]	MC [%]	MLoc [%]	EI [%]
SN-C	8,16	32,18	26,05	6,13	0	0,77	67,05
SN-PTX	7,68	32,96	29,63	2,59	0,74	0,74	66,3
SN-MI	8,16	47,39	39,02	8,36	0	1,05	51,57
SX-C	13,76	13,96	12,34	1,62	0	0,97	85,06
SX-PTX	8,76	9,42	8,77	0,65	0	0,32	90,26
SX-MI	9,7	7,53	7,53	0	0	0	92,47

CE: concentración espermática

MP: motilidad progresiva

ML: motilidad lenta

MR: motilidad rápida

MLoc: motilidad local

EI: espermatozoides inmóviles

8.2 Experimento 2:

Al comparar el comportamiento de los diferentes tratamientos (sin aditivos, MI y PTX) en la FIV, con el SN no se encontraron diferencias significativas entre ellos en cuanto al clivaje (SN-C 60/93; SN-MI 57/93; SN-PTX 62/94) y al desarrollo embrionario respecto a los clivados (43,3%; 52,6% y 58,1% respectivamente) ($p > 0,05$). Respecto al SX, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto al clivaje entre los diferentes grupos (SX-C 66/95; SX-MI 58/93; SX-PTX 62/93), sin embargo, con el uso de MI hubo mayor desarrollo embrionario (63,8%) ($p = 0,02$) con

respecto al grupo control (42,4%), y una tendencia a mejorar sobre el uso de PTX (46,8%) ($p=0.06$).

Tabla 8: Clivaje y desarrollo embrionario en FIV con los distintos tratamientos sobre SN y SX.

TRATAMIENTO	COC	Clivaje	% Clivaje	DE *	DE/Clivaje (%)	DE/COC (%)
SN-C	93	60	64,5	26 ^a	43,3	28,0
SN-PTX	94	62	66,0	36 ^a	58,1	38,3
SN-MI	93	57	61,3	30 ^a	52,6	32,3
SX-C	95	66	69,5	28 ^a	42,4	29,5
SX-PTX	93	62	66,7	29 ^a	46,8	31,2
SX-MI	93	58	62,4	37 ^b	63,8	39,8

*Diferentes superíndices indican diferencias significativas

COC: cumulus oophorus

DE: Desarrollo embrionario

9. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, la adición de MI sobre el SN generó una disminución en BCF y en el porcentaje de motilidad progresiva durante la incubación. Esta última también se vio disminuida durante la capacitación en comparación a los demás grupos experimentales (SN-C y SN-PTX), recuperando algunos puntos porcentuales en la evaluación realizada a las 2 horas (termorresistencia).

En cambio, el fenómeno contrario ocurrió en el SX incubado con el mismo aditivo, los parámetros VCL y VAP se vieron incrementados, al igual que la motilidad progresiva. Esta última fue menor en las evaluaciones posteriores (capacitación y termorresistencia).

La literatura científica es extensa y coincidente en que la suplementación con MI juega un rol preponderante en aumentar la motilidad y varios parámetros seminales, y su efecto es más pronunciado en muestras seminales con diferentes grados de injuria, lo que podría atribuirse a su efecto antioxidante, actividad procinética, mejora de la actividad mitocondrial, entre otras (De Luca, Colone, Gambioli, Stringaro & Unfer, 2021). En el caso de la disminución porcentual ocurrida a las 2 horas en la motilidad progresiva del SX observadas en el presente trabajo, las causas pueden ser variadas y acumulativas, se pueden señalar los daños en los espermatozoides durante el proceso de sexado de semen que determinan un estado de membrana más avanzado asemejándose a una capacitación *in vitro*, estrés físico, tinciones, cambios de presión, entre otros factores (Graaf, Leahy & Vishwanath, 2014). Además de la potenciación metabólica inducida por el MI que genera mayor producción de ERO, provocando estrés oxidativo y daños sobre las células espermáticas (Limongi *et al.*, 2018); esto conduce directamente al fracaso en la fertilización, tasas de clivaje, blastocitos y preñeces más bajas (Wheeler *et al.*, 2006; De Luca *et al.*, 2021). Resultados similares fueron observados por Limongi *et al.* (2018), cuando las muestras seminales se incubaron durante 2 horas en un medio con 30 mM de MI a 37°C; en este último experimento se adicionaron diferentes concentraciones de MI al semen de caprinos

pos descongelado (5 mM, 15 mM y 30 mM) y controlaron la motilidad subjetiva, integridad (test eosina/nigrosina) y funcionalidad (test hiposmótico) de la membrana plasmática a la hora 0 y 2. Para las concentraciones más bajas no se encontró efecto de la sustancia sobre los parámetros observados, en cambio, para la concentración de 30 mM cuando se incubó por 2 horas a 37°C resultó perjudicial para las células espermáticas, viéndose disminuida la motilidad. Los autores lo atribuyen a la hiperactivación que ejerce la sustancia sobre los espermatozoides y su producción de ERO. En equinos a 30 mM no tuvo efecto sobre la viabilidad espermática.

En humanos con alteraciones espermáticas, la adición de MI mejoró la actividad mitocondrial (Condorelli *et al.*, 2012); la motilidad progresiva se ve mejorada en pacientes con oligoastenozoospermia, mientras que en pacientes normospermicos aumentó tanto la motilidad total como la progresiva (Artini *et al.*, 2017). Con el fin de evaluar la actividad antioxidante, entre otros parámetros seminales, Kulaksiz *et al.*, (2011), probaron concentraciones de 5 mM y 10mM adicionados a diferentes crioprotectores seminales en carneros; y observaron que la motilidad, viabilidad e integridad de membrana espermática y de marcadores de estrés oxidativo no se vieron afectados en la mayoría de los casos, excepto para la adición del diluyente con 10 mM de MI, en el que se evidenció una reducción significativa de malonaldehído, uno de los marcadores usados para medir estrés oxidativo.

En perros (*Canis lupus familiaris*), Qamar, Fang, Kim & Cho (2019) evaluaron concentraciones de 0,1, 1 o 2 mg/ml de MI en diluyentes de semen para criopreservación. En semen fresco la concentración de 2 mg/ml resultó en una disminución de la motilidad y viabilidad espermática. Para las muestras congeladas/descongeladas, la concentración de 1 mg/ml aumentó significativamente la motilidad porcentual, LIN, STR, ALH, viabilidad, integridad de membrana y en el porcentaje de acrosoma intacto. Además de un aumento en la penetrancia en el mucus cervical, indicador de fertilización y tasas de preñez más altas, y una disminución en la expresión de genes pro apoptóticos. Los autores señalan una posible toxicidad o daño espermático por cambios de presión osmótica con la concentración más alta de MI, recomendando el uso de 1 mg/ml para dicha especie.

Respecto a la PTX, Negri *et al.* (1996), en humanos demostraron que el tratamiento del semen con oligoastenozoospermia con este aditivo genera un aumento significativo en la preñez intrauterina, mientras que su uso en semen sin alteraciones no genera ningún efecto significativo. Por ello concluyen que utilizar PTX en semen sin defectos en la motilidad espermática no muestra beneficio. Esta afirmación se puede relacionar con resultados de nuestra investigación, donde existió un efecto significativo de la PTX durante la incubación exclusivamente sobre el SX, y no sobre el SN, siendo una posible explicación los mayores defectos presentes en espermatozoides del SX a causa del proceso de sexaje. A su vez, Fernández Abella *et al.* (2006), reportaron que el uso de PTX en muestras de semen ovino congelado/descongelado de baja calidad produce incrementos en la fertilidad, no afectando aquellas con alta calidad.

Zúñiga Morales (2015), mediante el estudio del efecto de la PTX sobre la motilidad espermática de semen obtenido del epidídimo de rata, en sus diferentes regiones (cabeza, cuerpo y cola), concluyó la existencia de un efecto positivo de la PTX en la activación de la motilidad progresiva de aquellos espermatozoides obtenidos de la cabeza y cuello del epidídimo, sin alterar su velocidad de desplazamiento. Además,

afirma que los efectos de la PTX son visibles en las células menos maduras. Por lo que, el uso principal de esta sustancia radica en la activación de espermatozoides con alteración en su motilidad. Esto podría explicar por qué en nuestra investigación los valores porcentuales de motilidad progresiva para el SN y SX no fueron mayores para el grupo adicionado con PTX respecto al grupo control.

Incluso en el trabajo realizado por Stephens *et al.* (2013), sobre semen equino congelado, se indicó con similitud, un efecto positivo de la PTX en la motilidad seminal más marcado sobre aquel semen con pobre motilidad. El uso de PTX además de mejorar la motilidad total y progresiva, mejora parámetros de VCL, VAP y VSL. Estos resultados son compartidos con los obtenidos en nuestro trabajo sobre los parámetros de VCL y VAP en SX. Sin embargo, tanto Moohan, Winston & Lindsay (1993), como Kay, Coutts & Robertson (1993), investigando el uso de PTX en semen humano, hallaron un efecto significativo de la sustancia, en los parámetros de VCL y ALH, este último no arrojó diferencias significativas en nuestro estudio.

Resultados de nuestra evaluación indican propiedades positivas de la PTX sobre la termorresistencia, evaluada luego de 2 horas posteriores a la descongelación, tanto en SX como en SN. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en humanos por Aparicio *et al.* (1980), que indicaron una reducción del porcentaje de espermatozoides muertos y un aumento de la duración de la actividad espermática en muestras alteradas (astenozoospermia) y normales, luego de la segunda y cuarta hora posrecolección. Incluso, se ha observado que la adición de PTX al semen de toro descongelado permitió prolongar la viabilidad del mismo (Vega *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2014).

La adición de PTX (3,6 mM) a espermatozoides de Búfalo, obtuvieron como resultado una mejoría significativa en la calidad del semen (motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y de membrana). Considerando varios grupos de aditivos evaluados, el semen tratado con PTX obtuvo mayor porcentaje de espermatozoides que reaccionaron de forma positiva al HOST (test de hiposmosis) (Bishist *et al.*, 2020). El fundamento de HOST es evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática tras someter a los espermatozoides a un medio hiposmótico, generando entrada de agua a la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica intra y extracelular, aquellos espermatozoides con la membrana plasmática intacta producirán un hinchamiento y enrollamiento del flagelo (Moreno *et al.*, 2016).

A pesar de las propiedades farmacológicas de la PTX ya conocidas, que explican su efecto positivo en la funcionalidad espermática, como por ejemplo en la hiperactivación y la reacción acrosómica, algunos autores adjudican diferentes resultados al uso de PTX a la variabilidad de respuesta individual entre pacientes humanos a la sustancia (Tournaye *et al.*, 1995; Moohan *et al.*, 1993); fenómeno que se podría evaluar utilizando muestras de diferentes toros.

En nuestro trabajo se pudo evidenciar un mayor desarrollo embrionario ($p=0,01$) con el uso de MI sobre el SX, coincidente con la evidencia científica donde se utilizó el MI sobre medios de fertilización en diferentes concentraciones (0,02, 0,03 y 0,04 g/l), y se vio que a medida que aumentaba la misma, el desarrollo embrionario fue mayor con respecto al control sin adición de MI (Soltani *et al.*, 2012) o en que su concentración en el fluido folicular eran más altas (Chiu & Tam, 1992; Chiu *et al.*,

2002; Vitale S. *et al.*, 2016), resultando en una mayor tasa de desarrollo embrionario y se asoció con ovocitos y embriones de mejor calidad.

Sin embargo, en equinos Brom de Luna *et al.* (2021), adicionaron 10 mM de MI al medio de cultivo de embriones, no viendo afectadas las tasas de desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto.

10. CONCLUSIONES

Ambos tratamientos (PTX y MI) resultaron favorables en mejorar VCL, VAP durante la incubación del SX. Se evidenció un efecto positivo del uso de la PTX en la termorresistencia, sobre semen convencional mostró mayores resultados para VCL, VAP y HAC, y en semen sexado fue mayor el HAC y una tendencia a mejorar el VCL.

Respecto a la fecundación in vitro, el tratamiento del semen sexado con MI favoreció el desarrollo embrionario.

Se concluye que está justificado el uso de los aditivos antes mencionados cuando se trabaja con SX.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABS Global Uruguay. (2020, 1 abril). *Sexcel® Sexed Genetics – haga el reemplazo de sus vaquillas desde sus mejores vacas*. Recuperado de <https://www.absglobal.com/uy/services/sexcel/>
- Affonso, F. J., Carvalho, H. F., Lançon, R., Lemes, K. M., Leite, T. G., Oliveira, L. Z., ...de Arruda, R. P. (2017). Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 59, 57-63.
- Ahmed, H., Andrabi, S.M., Anwar, M., & Jahan, S. (2017). Uso de parámetros de calidad del semen post-descongelado para predecir la fertilidad del toro búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) durante la temporada alta de reproducción. *Andrologia*, 49(4). <https://doi.org/10.1111/and.12639>
- Ahmed, H., Andrabi, S. M., & Jahan, S. (2016). Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. *Theriogenology*, 86(6), 1516-1522.
- Amann, R.P., & Gill, S.P.S. (2000). Correlation or diagnosis and prediction? *Proceedings of the International Congress on Animal Reproduction*, 14(1), 69.
- Aparicio, N.J., Schwarzstein, L., & de Turner, E.A. (1980). Pentoxifylline (BL191) by oral administration in the treatment of asthenozoospermia. *Andrologia*, 12, 228–231.
- Artini, P. G., Casarosa, E., Carletti, E., Monteleone, P., Di Noia, A., & Di Berardino, O. M. (2017). Efecto in vitro del mioinositol sobre la motilidad de los espermatozoides en pacientes normales y oligoastenospermia sometidos a fecundación in vitro. *Endocrinología ginecológica*, 33(2), 109-112.
- Barakat, I.A., Danfour, M.A., Galewan, F.A., & Dkhil, M.A. (2015). Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *BioMed Research International*, 2015, 948575.
- Benavides Torres, R. D. (2008). *Evaluación de tres protocolos de capacitación espermática bovina in vitro a través de la penetración oocitaria* (Tesis de grado). Universidad de la Salle, Bogotá.

- Bishist, R., Raina, V. S., Bhakat, M., Mohanty, T. K., Lone, S. A., & Sinha, R. (2020). Effect of antioxidant additives on freezability of buffalo spermatozoa. *Buffalo Bulletin*, 39(3), 337-344.
- Boni, R., Gallo, A., & Cecchini, S. (2017). Kinetic activity, membrane mitochondrial potential, lipidperoxidation, intracellular pH and calcium of frozen/thawed bovine spermatozoa treated with metabolic enhancers. *Andrology*, 5, 133–145
- Brackett, B.G., & Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 12, 260-274.
- Brom-de-Luna, J. G., Salgado, R. M., Felix, M. R., Canesin, H. S., Stefanovski, D., Diaw, M., & Hinrichs, K. (2021). Culture protocols for horse embryos after ICSI: Effect of myo-inositol and time of media change. *Animal Reproduction Science*, 233, 106819.
- Bruno, J. J., Gange, J. M., Seró, C., Vittone, S., Otero, G., Monje, A., & Gerasi, J. (2009). *Experiencia de engorde de terneros macho Holando*. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/cria_artificial/11-Engorde-de-Terneros-Macho-Holando.pdf
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., & Collodel, G. (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis?. *Fertility and Sterility*, 96(1), 24-27.
- Castelo, M.E. (2021). *Evaluación de la tasa de preñez a la IATF en vacas lecheras en ordeño inseminadas con semen producido por dos tecnologías de sexado (Sexcel® vs SexedULTRA)* (Doctoral dissertation). Universidad Nacional de Córdoba.
- Chiu, T. T., Rogers, M. S., Law, E. L., Briton-Jones, C. M., Cheung, L. P., & Haines, C. J. (2002). Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality. *Human Reproduction (Oxford)*, 17(6), 1591–1596. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.6.1591>
- Chiu, T. T., & Tam, P. P. (1992). A correlation of the outcome of clinical in vitro fertilization with the inositol content and embryotrophic properties of human serum. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 9(6), 524-530.

- Colone, M., Marelli, G., Unfer, V., Bozzuto, G., Molinari, A., & Stringaro, A. (2010). Inositol activity in oligoasthenoteratospermia – an in vitro study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14, 891–896.
- Condorelli, R.A., La Vignera, S., Bellanca, S., Vicari, E., & Calogero, A.E. (2012) Myoinositol: does it improve sperm mitochondrial function and sperm motility? *Urology*, 79, 1290-1295.
- de Graaf, S. P., Leahy, T., & Vishwanath, R. (2014). *Biological and practical lessons associated with the use of sexed semen*. Recuperado de <https://www.bioscioproceedings.org/bp/0008/bp0008rdr35.pdf>
- De Luca, M.N., Colone, M., Gambioli, R., Stringaro, A., & Unfer, V. (2021). Estrés oxidativo y fertilidad masculina: papel de los antioxidantes e inositoles. *Antioxidantes (Basilea)*, 10(8), 1283. <https://doi.org/10.3390/antiox10081283>
- Dinicola, S., Unfer, V., Facchinetti, F., Soulage, C. O., Greene, N. D., Bizzarri, M., ... & Wdowiak, A. (2021). Inositols: From established knowledge to novel approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10575.
- Downes, C. P. (1989). The cellular functions of myo-inositol. *Biochemical Society Transaction*, 17(2), 259-268. <https://doi.org/10.1042/bst0170259>
- Duarte Junior, M. F., Zervoudakis, L. K., Zervoudakis, J. T., Nichi, M. M., Silva, L. E., Tsuneda, P. P., ... Losano, J. D. (2016). Utilização de pentoxifilina e antioxidantes na criopreservação do sêmen bovino: qualidade seminal e estresse oxidativo. *Ars Veterinaria*, 32(2), 110-116.
- Evans, G., Hollinshead, F.K., & Maxwell, W.M. (2004). Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 16, 455-64.
- Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., & Foote, R. H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49(4), 871-879.

- Faust, M. A., Betthausen, J., Crego, S., & Storch, A. (2016). Fertility and sex of calf results from a new commercial scale technology platform for producing sexed sperm. *Journal of Animal Science*, 94, 544-544.
- Faust, M. A., Betthausen, J., Storch, A., & Crego, S. (2016). 1133 Effects for fertility of processing steps of a new technology platform for producing sexed sperm. *Journal of Animal Science*, 94(supl. 5), 544-544.
- Fernández Abella, D., Guérin, Y., Sterla, S., Irabuena, O., & Dacheux, J.L. (2006). Efecto de dos diluyentes para conservación de semen refrigerado y del momento de inseminación sobre la fecundidad ovina. *Producción Ovina*, 18, 41-47.
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004.
- Filipiak, Y., & Larocca, C. (2010). *Manual de fertilización in vitro en bovinos*. Montevideo: Facultad de Veterinaria, Udelar.
- Garbers, D.L., First, N.L., Sullivan, J.J., & Lardy, H.A. (1971). Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Biology of Reproduction*, 5, 336–339.
- García Pintos, M. (2021, agosto 6). Se encuentra activa una operativa de compra de vaquillonas cruza entoradas para enviar a China en pie. *El País. Rurales*. Recuperado de <https://rurales.elpais.com.uy/exportacion-en-pie/se-encuentra-activa-una-operativa-de-compra-de-vaquillonas-cruza-entoradas-para-enviar-a-china-en-pie>
- Garner, D. L., & Seidel Jr, G. E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69(7), 886-895.
- González, G. J. (2007). Pentoxifilina: revisión de sus características farmacológicas y utilización en la práctica clínica. *Revista flebología y linfología, lecturas vasculares*, 2(4), 157-220.
- González-Urbaneja, I. (2006). Radicales libres: Algunas consideraciones clínicas. *Gaceta Médica de Caracas*, 114(2), 91-98.

- Hamano, K. (2007). Sex preselection in bovine by separation of X and Y chromosome bearing spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 53, 27-38.
- Henkel, R.R., & Schill, W.B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 108.
- Hutchison, J. L., & Norman, H. D. (2009). Characterization and usage of sexed semen from US field data. *Theriogenology*, 71(1), 48-48.
- Instituto Nacional de Carnes. (2022). *Exportación de Ganado en pie*. Recuperado de <https://www.inac.uy/innovaportal/v/20348/10/innova.front/exportacion-de-ganado-en-pie>
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (2021). *XIX Taller de evaluación de los diagnósticos de gestación vacuna*. Recuperado de <http://www.inia.uy/estaciones-experimentales/direcciones-regionales/inia-treinta-y-tres/XIX-Taller-de-evaluacion-de-los-diagnosticos-de-gestacion-vacuna>
- Izquierdo, A. C., Reyes, A. E. I., Espinosa, R., Cervantes, J. E. G. L., Castro, J. F. I., de Lourdes, M., ...Denis, B. E. R. (2016). Aplicación de la citometría de flujo en veterinaria. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(2), 60-73.
- Johnson, L.A., Flook, J.P., & Hawk, H.W. (1989). Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction*, 41,199-203.
- Kay, V. J., Coutts, J. R. T., & Robertson, L. (1993). Pentoxifylline stimulates hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 8(5), 727-731.
- Kulaksiz, R., Bucak, M.N., Akcay, E., Ssakin, F., Daşkin, A., & Ateşşahin, A. (2011). The effects of different extenders and myo-inositol on post-thaw quality of ram semen. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 17(2), 217-22.
- Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Ernst, E., Hjollund, N. H., ... & Danish First Pregnancy Planner Study Team. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, 15(7), 1562-1567.

- Limongi, R. S., Farias, C. F. A., Rique, A. S., Silva-Neto, J., & Silva, S. V. (2018). Efeito da adição do mio-inositol sobre os parâmetros de avaliação do sêmen caprino pós-criopreservação. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 12(2), 136-142.
- Lindsey, A.C., Bruemmer, J.E., & Squires, E.L. (2001). Low dose insemination of mares using nonsorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction Science*, 68, 279-89.
- Lizarraga, R.M., Galarza, E.M., Ventura, M.B., y Mattioli, G.A. (2015, agosto). Minerales y vitaminas como condicionantes de la salud y la producción animal. En *V Congreso Argentino de Nutrición Animal*. CAENA, Buenos Aires. Recuperado de <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/minerales-vitaminas-como-condicionantes-t32538.htm>
- Martínez, C. D., Vargas, C. R., & Arancibia, S. R. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina*, 46(6), 229-235.
- Moohan, J. M., Winston, R. M. L., & Lindsay, K. S. (1993). Andrology: Variability of human sperm response to immediate and prolonged exposure to pentoxifylline. *Human Reproduction*, 8(10), 1696-1700.
- Moreno, A. Q., Mayorga-Torres, J. M., & Maya, W. C. (2016). El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros/ semen analysis as a tool to predict the reproductive potential in bulls. *Journal of Veterinary Andrology*, 2(1), 30-37.
- Naz, R. K., & Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1-12.
- Negri, P., Grechi, E., Tomasi, A., Fabbri, E., & Capuzzo, A. (1996). Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination. *Human Reproduction*, 11(6), 1236-1239.
- Niwa, K., & Ogoda, O. (1988). Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30, 733-741.
- Numabe, T., Oikawa, T., Kikuchi, T., & Horiuchi, T. (2001). Pentoxifylline improves in vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 56, 225-233.

- Ogoda, O., Niwa, K., Yuhara, M., Takahashi, S., & Kanoya, K. (1987). Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology*, 29, 1375-1381.
- Oses, M. V., Teruel, M. T., & Cabodevila, J. A. (2009). Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *Revista Veterinaria*, 20(2), 138-145.
- Parck, C.K., Ohgoda, O., & Niwa, K. (1989). Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86(2), 577-582.
- Parrish, J. (2014). Bovine in vitro fertilization. In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81, 67-73.
- Perry, G. A., Walker, J. A., Rich, J. J. J., Northrop, E. J., Perkins, S. D., Beck, E. E., ... Mokry, F. B. (2020). Influence of Sexcel™ (gender ablation technology) gender-ablated semen in fixed-time artificial insemination of beef cows and heifers. *Theriogenology*, 146, 140-144. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.030>
- Petrunkina, A. M., Simon, K., Günzel- Apel, A. R., & Töpfer- Petersen, E. (2003). Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *Journal of Andrology*, 24(3), 423-437.
- Qamar, A.Y., Fang, X., Kim, M.J., & Cho, J. (2019). La suplementación con mioinositol del medio de congelación mejora los parámetros relacionados con la calidad del espermatozoa de perro. *Animales (Basilea)*, 9(12), 1038.
- Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreier, L.L., & Johnson, L.A. (1999). In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of chromosomebearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *Journal of Animal Science*, 77, 3346-52.

- Ródenas, C., Riera, I. P., & Arjona, X. L. (2020). Preselección del sexo mediante citometría de flujo en la especie canina: situación actual. *Clínica veterinaria de pequeños animales*, 40(2), 83-88.
- Rodríguez-Martínez, H. (2003). Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia? *Reproduction in Domestic Animals*, 38, 312-318.
- Salgado-Cruz, E., & Lopera-Vásquez, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3), e17138.
- Salinas, P. (2016). Citometría de flujo y sexaje de espermatozoides en animales. *International Journal of Medical and Surgical Sciences*, 3, 893-902.
- Schenk, J. L., Suh, T. K., Cran, D. G., & Seidel, G. E., Jr (1999). Criopreservación de espermatozoides bovinos clasificados por flujo. *Theriogenology*, 52(8), 1375–1391. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00224-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00224-1)
- Seidel Jr, G. E., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D., & Cran, D. G. (1999). Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, 52(8), 1407-1420.
- Seidel, Jr, G. E., & Seidel, S. M. (1991). *Training manual for embryo transfer in cattle*. Roma: FAO.
- Sistema Nacional de Información Ganadera. (2019-2020). *Declaración Jurada anual de existencias*. Recuperado de <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiNjZjMmQ4MzltNTY4My00ZjM4LWEwZGI0MDQyYWVzMzFmYzQ2IiwidCI6IjNlY2RjZTZkxLWEwOTctNDdjYy1iMWUzLWJiOWVzNjExNGI1NSIsImMiOiR9&pageName=ReportSection1>
- Datos actualizados basados en la Declaración Jurada de Existencias DICOSE – SNIG 2021. (s. f.). Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/datos-actualizados-basados-declaracion-jurada-existencias-dicose-snig-2021>. Revisado 21/08/22

- Soltani, L., Kafilzadeh, F., & Shabankareh, H. K. (2012). The effect of various concentrations of myo-inositol in culture medium on development of bovine embryos. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 10(5), 409.
- Stephens, T. D., Brooks, R. M., Carrington, J. L., Cheng, L., Carrington, A. C., Porr, C. A., & Splan, R. K. (2013). Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(8), 615-621.
- Stringfellow, D. A., & Givens, M. D. (2009). A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. En *Manual of the International Embryo Transfer Society*, editor. *International Embryo Transfer Manual* (4^a ed., p. 151). Savoy: IETS.
- Sun, W., Li, Y., Su, J., Bao, X., Ding, R., Zhao, G., ..., Li, X. (2021). Correlation between in vitro fertilization and artificial insemination in Holstein bulls. *Animal Bioscience*, 34(12), 1879-1885. <https://doi.org/10.5713/ab.20.0665>
- Thangamani, A., Srinivas, M., Chandra Prasad, B., Anusha, K., & Sadasiva Rao K. (2018). Semen additives for improves motility and fertility of bovine spermatozoa - A review. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 7(2), 554-560.
- Tournaye, H., Devroey, P., Camus, M., Van der Linden, M., Janssens, R., & Van Steirteghem, A. (1995). Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Human Reproduction*, 10(suppl. 1), 72-79.
- Uruguay concretó la venta de 7.000 cabezas de ganado en pie a China, tras cinco años sin exportación. (2020). Recuperado de <https://www.gub.uy/presidencia/comunicacion/noticias/uruguay-concreto-venta-7000-cabezas-ganado-pie-china-tras-cinco-anos-sin#>
- Valverde, A., & Madrigal-Valverde, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469-484.
- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., & Zambrana-Jiménez, A. (2018). Assessment of boar sperm kinetics and motility in tropical conditions. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 12, 125-132.

- Vega, A., Wilde, O., & Cruz, M. (1997). Efectos de la Pentoxifilina y la Cafeína sobre la motilidad de espermatozoides bovinos criopreservados. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 12(2), 75-79.
- Viada Pupo, E., Gómez Robles, L., & Campaña Marrero, I. R. (2017). Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*, 21(1), 171-186.
- Villanueva, E., & Mellisho, E. (2011). Fertilidad de semen sexado "X" comercial en vacunos de leche. *APERMOVA*, 1(1), 106-107.
- Vitale, S. G., Rossetti, P., Corrado, F., Rapisarda, A. M. C., La Vignera, S., Condorelli, R. A., ... Buscema, M. (2016). How to achieve high-quality oocytes? The key role of myo-inositol and melatonin. *International Journal of Endocrinology*, 2016, 4987436.
- Wheeler, M. B., Rutledge, J. J., Fischer-Brown, A., Vanetten, T., Malusky, S., & Beebe, D. J. (2006). Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65(1), 219-227.
- Xu, J., Chaubal, S.A., & Du, F. (2009). Optimizing in vitro fertilization with sexed sperm in cattle. *Theriogenology*, 71, 3947.
- Yang, X., Jiang, S., & Foote, R.H. (1993). Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Molecular Reproduction and Development*, 34, 94-100
- Zhang, J., Guo, H., Su, J., Zhao, L., Li, Y., Sun, W., ...Li X (2014). A comparison of the effects of Pentoxifylline on quality of fresh and frozen-thawed bull spermatozoa. *Agricultural Biotechnology*, 3(3), 20-24, 29.
- Zhang, X., Sharma, R.K., Agarwal, A., & Falcone, T. (2005). Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 22(11-12), 415-417.
- Zúñiga Morales, J. C. (2015). *Efecto de la Pentoxifilina sobre la movilidad de espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo de rata* (Tesis de grado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

12. ANEXOS

EFFECTO DE LA PENTOXIFILINA Y MIO-INOSITOL SOBRE LOS PARÁMETROS DE MOTILIDAD, CINÉTICA Y FERTILIDAD IN VITRO DEL SEMEN SEXADO BOVINO CONGELADO-DESCONGELADO

Autores: Valentina Alvarez; Franco Alvira; Agustín Ferreira; Marcos Pereira, Fabián Roda

Docentes responsables: Yael Filippiak, Jorge Gil

Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil, año 2020

1) Introducción

Con la creciente adopción de tecnologías reproductivas, es fundamental conocer el efecto que nos pueden brindar los diferentes aditivos usados sobre el semen y/u ovocitos para mejorar diferentes parámetros que redunden en mejores tasas de preñez. Con ese fin nos embarcamos en estudiar el efecto del mioinositol (MI) y la pentoxifilina (PTX) sobre el semen sexado (SX) y no sexado (SN), con el fin de poder avalar estudios anteriormente realizados, aportar nuevos resultados, y brindar a la comunidad científica otras opciones en pro de mejorar futuros resultados.

La aplicación del SX en inseminación artificial (IA) resulta en una menor tasa de preñez con respecto al uso de SN debido a la baja concentración de espermatozoides en cada dosis de SX, y que durante su procesamiento los espermatozoides sufren mayor daño oxidativo que el SN.

Cuando se usa SX en IA en el mejor de los casos se fertiliza un ovocito in vivo. En cambio, en fertilización in vitro (FIV) con tan solo 1000 espermatozoides se puede fertilizar un ovocito (Yang y col., 1993).

Si bien no es posible evitar el estrés oxidativo, se puede reducir utilizando sustancias antioxidantes como la PTX y MI, que describimos a continuación.

La PTX es una metil-xantina [7-dimetil-1-(5-oxo-hexil)-xantina], es un activador de la movilidad espermática y antioxidante (Zhang y col., 2014)

El MI es un azúcar cíclico, perteneciente al grupo del complejo B (vitamina B7). El Inositol mejora la morfología y actividad mitocondrial y presenta acción antioxidante. El MI se ha propuesto como activador de la motilidad espermática dada la importancia que tienen las mitocondrias en la función espermática, a la vez que incrementa el potencial de membrana (Colone y col., 2010; Condorelli y col., 2012).

3) Materiales y métodos

Se utilizó SX y SN de una misma partida seminal del mismo toro.

Experimento 1:

Se evaluó el efecto de la PTX y el MI sobre los parámetros de motilidad y cinética en Sistema CASA. En total se evaluaron 3 veces cada grupo (tras el pretratamiento, post capacitación y luego de la incubación durante 2 horas (termorresistencia)).

Las muestras descongeladas se pre trataron con los antioxidantes mencionados según los grupos experimentales,

SN-C: incubación por 30 min. en mTCM-199.

SN-PTX: incubación por 30 min. en mTCM-199 adicionado con PTX, 6 mM.

SN-MI: incubación por 30 min. en mTCM-199 adicionado con MI, 0,72 M.

SX-C incubación por 30 min. en mTCM-199.

SX-PTX: incubación por 30 min. en mTCM-199 adicionado con PTX, 6 mM.

SX-MI: incubación por 30 min. en mTCM-199 adicionado con MI, 0,72 M.

Los datos fueron analizados con ANOVA y test de Student, con un nivel de significación del 5%.

Experimento 2:

Se obtuvieron 561 complejos ovocito-cúmulo (COC) de ovarios bovinos provenientes de frigorífico de menos de 5h de faenados, transportados en solución salina isotónica a 37°C. El contenido de los folículos de 2-8 mm de diámetro se aspiró mediante jeringa con aguja hipodérmica 18G, utilizando medio buffer fosfato salino modificado (m-PBS), con 5 % de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos, utilizando COC clase A según normas de la IETS.

Maduración In Vitro: los COC se lavaron 2 o 3 veces en cajas de Petri de 35 mm de diámetro con m-PBS y se cultivaron para su maduración en TCM-199 + 5% SFB + Hormonas, en gotas de 100 µl en grupos de 10 COC por gota, cubiertos con aceite mineral, en incubadora (a 38°C, con 5% de CO₂ y 90-95% de humedad) por 22h.

FIV: los COC fueron divididos en 6 grupos e inseminados con el semen previamente tratado y capacitado. Se formaron gotas de 100 µl con el semen, se cubrieron con aceite mineral y se colocaron en las gotas los ovocitos madurados, en una relación de 10 COC/gota. Se pusieron en la incubadora (a 38,5°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad), por 18h.

Desarrollo In vitro: después de la inseminación, los presuntos cigotos se cultivaron en medio CR1aa+5% de SFB, en la incubadora por 7 días. A las 48h de incubación se el estudio de clivaje y a los 7 días desde la fecundación se evaluó el desarrollo embrionario.

Resultados analizados por test de Chi cuadrado, con nivel de significación del 5%.

2) Objetivos

Objetivo general:

Evaluar el efecto del tratamiento con Pentoxifilina y Mio-Inositol, sobre los parámetros de motilidad y cinética y sobre la fertilidad in vitro del semen bovino sexado, teniendo como referencia los resultados alcanzados con SN de los mismos animales.

Objetivos Específicos:

1) Se estudió el efecto del tratamiento con PTX o MI al descongelado, sobre los parámetros de motilidad y cinética del SX.

2) Se evaluó el efecto del tratamiento con PTX o MI al descongelado, sobre la termo-resistencia a las 2 horas del SX

3) Se determinó el efecto del tratamiento con PTX o MI, sobre la fertilidad in-vitro del SX y el desarrollo embrionario.

4) Resultados

En los parámetros evaluados en incubación del SN se observó una tendencia a disminuir el VAP (p=0.08) para el grupo tratado con PTX, el BCF tuvo una disminución significativa (p<0.05) para los tratamientos con PTX y MI, Con respecto a la evaluación realizada a las 2 horas, se evidenció un aumento en VCL, VAP, WOB y HAC (p<0.05) en el semen tratado con PTX.

Sobre el SX, se halló un aumento significativo en VCL y VAP durante la incubación en los grupos tratados con MI y PTX (p<0.05). Evaluando la termo-resistencia a las 2 horas existió un aumento en HAC (p<0.05) en el semen tratado con PTX; además se encontró una tendencia al aumento del VCL (P=0.09) para el mismo tratamiento. Los valores de motilidad progresiva en el SN aumentaron en grupos adicionados con PTX y MI durante la termorresistencia; y para el SX aumentaron durante la incubación.

Al comparar el comportamiento de los diferentes tratamientos (sin aditivos, MI y PTX) en la FIV (clivaje y desarrollo), solamente en el SX, el desarrollo embrionario mostró un aumento significativo a favor del uso de MI (63,8%) (p=0,01) y una tendencia al aumento con el uso de PTX (46,8%), ambos con respecto al grupo control (42,4%) (p>0,05).

Gráficos: Resultados de motilidad progresiva (%) para SX y SN

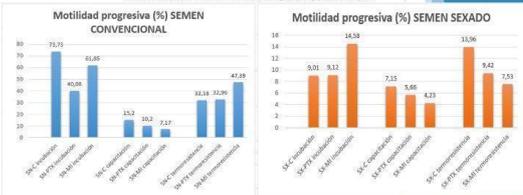


Tabla: Resultados de clivaje y desarrollo embrionario en FIV

TRATAMIENTO	COC	Civaje*	% Civaje	DE*	Dicivaje (%)	DECOCS (%)
SN-C	83	60 ^a	84,8	29 ^a	43,3	28,0
SN-PTX	94	62 ^a	66,0	36 ^a	58,1	38,3
SN-MI	93	57 ^a	81,3	30 ^a	52,6	32,3
SX-C	95	69 ^a	69,5	29 ^a	42,4	23,5
SX-PTX	93	62 ^a	66,7	29 ^a	46,8	31,2
SX-MI	93	59 ^a	62,4	37 ^a	63,8	39,8

*Diferentes superíndices indican diferencias significativas
COC: cumulus oophorus
DE: Desarrollo embrionario

5) Conclusiones

Ambos tratamientos (PTX y MI) resultaron favorables en mejorar algunos parámetros seminales durante la incubación del SX. Se evidenció un efecto positivo del uso de la PTX sobre la termo-resistencia tanto en el SX como en el SN.

Respecto a la FIV, el tratamiento con MI favoreció el desarrollo embrionario en el SX, y una tendencia al aumento del desarrollo con el uso de PTX sobre el mismo semen.

Se justifica el uso de los aditivos antes mencionados cuando se trabaje con semen sexado.

