

Evaluación de la calidad seminal en semen porcino mediante dos técnicas de referencia *in vitro*

Assessment of seminal quality in boar sperm by means of two *in vitro* reference techniques

Maya Delgado Ángela María¹, Botero Herrera Rodrigo Andrés², Valencia Giraldo Julián Alonso³, Cárdenas Marulanda Diana Cristina⁴, Gómez Londoño German⁵, Henao Uribe Francisco Javier⁶.

Resumen

En el laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad de Caldas, se realizó la validación de dos técnicas de referencia *in vitro* para evaluación de la calidad seminal de semen porcino: el test de fragmentación del ADN espermático (TFAE) y el test de penetración *in vitro* con ovocitos inmaduros (TPIVOI), con el fin de obtener un análisis estandarizado y de mayor valor predictivo del potencial de fertilidad de una muestra seminal. Los protocolos adoptados para las dos técnicas, fueron evaluados mediante análisis de: Repetibilidad, Reproducibilidad, combinación de Repetibilidad y Reproducibilidad (R&R), Robustez e Incertidumbre. Los resultados mostraron que las dos técnicas son consistentes, no son afectadas por el analista, son adecuadas en relación de R&R, se establecieron condiciones de análisis en robustez y su incertidumbre es conocida; razón por la cual son conformes para su uso en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad de Caldas. La incorporación de los dos métodos como técnicas de alta resolución, constituye un avance considerable en la evaluación de la calidad seminal en la producción porcina colombiana.

Palabras clave. Fragmentación, ADN, Penetración, Validación, Fertilidad.

Abstract

Validation of two *in vitro* reference techniques was carried out in the Biology of Reproduction laboratory at Universidad de Caldas in order to assess the seminal

¹ Estudiante Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Caldas. angemaya89@hotmail.com

² Estudiante Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Caldas. Botero0513@hotmail.com

³ MVZ. Estudiante de maestría. Universidad de Caldas. julian.valencia@ucaldas.edu.co

⁴ Ingeniera de alimentos. MSc. Universidad de Caldas. diana.cardenas_m@ucaldas.edu.co

⁵ MVZ. Esp. MSc. Estudiante de doctorado. Universidad de Caldas. germgolo@ucaldas.edu.co

⁶ MVZ. PhD. Director del doctorado en Ciencias Agrarias. Universidad de Caldas. fhenao@ucaldas.edu.co



quality in boar sperm: The sperm DNA fragmentation assay (SDFA) and the *in vitro* penetration assay (IVPA) with immature oocyte, in order to obtain a standardized analysis and greater predictive value of the fertility potential of a seminal sample. The protocols adopted for both techniques were assessed by means of the analysis of: Repeatability, Reproducibility, Repeatability and Reproducibility combination (R&R), Robustness and uncertainty. The results showed that both techniques are consistent, they are not affected by the analyst, they are adequate in relation with the R&R, the robustness analysis conditions were established and uncertainty is known. For this reason they are approved to be used in the Biology of Reproduction laboratory at Universidad de Caldas. The incorporation of both methods, as high resolution techniques, constitutes a considerable advancement in the assessment of sperm boar quality in Colombian seminal production.

Keywords. Fragmentation, DNA, Penetration, Validation, Fertility.

Introducción

El uso de técnicas de laboratorio que tengan alto valor predictivo de la fertilidad de un eyaculado, es de crucial importancia para obtener una alta y constante eficiencia reproductiva (Xu *et al.*, 1998; Braundmeier y Miller, 2001; Diaz *et al.*, 2008), y una alta rentabilidad en granja (Henao *et al.*, 2007). Entre estas técnicas se encuentran, el TPIVOI, que proporciona información de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Martinez *et al.*, 1998) y el TFAE que nos da información de la integridad del material genético, que finalmente entrará en el ovocito (Pérez-Llano *et al.*, 2010).

Existe evidencia clara de la capacidad del TPIVOI de discriminar entre eyaculados que producen tasas de parto bajas, medias y altas; y entre eyaculados que producen tamaños de camada medios y bajos (Gadea, 1997; Gadea *et al.*, 1998); y aunque la tasa de penetración espermática obtenida en sistemas *in vitro*, no es equivalente al proceso *in vivo*, ésta nos proporciona una estimación útil de los espermatozoides con alta capacidad de fecundación (Gadea y Matas, 2000). Además, al utilizar ovocitos inmaduros con la zona pelúcida intacta, se cuenta con un inductor fisiológico de la reacción acrosómica (Braundmeier y Miller, 2004) y se hallan iguales tasas de penetración que el uso de ovocitos recién ovulados (Martinez *et al.*, 1996).

Respecto a la fragmentación del ADN espermático se ha encontrado relación de ésta con disminución del tamaño de la camada (Boe-Hansen *et al.*, 2008), y



aunque no existe una asociación clara con la fecundación (Seli et al., 2004), existe impacto del daño en el ADN del espermatozoide en el desarrollo del embrión (Seli et al., 2004; enciso 2009) y del feto (Pérez-Llano *et al.*, 2006), presumiblemente por defecto en la transcripción de genes de origen paterno en el momento en que son activados (Seli et al., 2004).

Actualmente, existe un kit (Sperm-Sus-Halomax®) para el análisis de la fragmentación del ADN en el semen de cerdo, adaptado por Enciso *et al.* (2006) a partir de la prueba de dispersión de la cromatina (SCD), del nombre en inglés *Sperm Chromatin Dispersion*) utilizada en humanos. El fundamento del Kit, se basa en la respuesta diferencial del núcleo de un espermatozoide con el ADN fragmentado y no fragmentado, a un tratamiento de desprotección con una solución desnaturizante ácida, así, los espermatozoides sin roturas en su ADN son resistentes a dicha desnaturización, y su material genético permanece como ADN de cadena doble sin desarrollar dispersión de la cromatina.

Los resultados obtenidos por una técnica o método tienen gran importancia en la toma de decisiones y en la repercusión económica de éstas, por lo tanto, el laboratorio y su personal, tienen la responsabilidad de generar resultados correctos y consistentes, lo cual se logra luego de un proceso de validación de las técnicas (Guía Eurachem, 2005). Los análisis realizados en un proceso de validación, reportados por la literatura internacional y aceptados por la comunidad científica y el sector productivo, generalmente son: de repetibilidad, de reproducibilidad, de R&R (Guía Eurachem, 2005), de robustez (Youden y Steiner, 1975) y de incertidumbre (Schmid y Lazos, 2000).

De acuerdo con el Vocabulario Internacional de Metrología, la repetibilidad y la reproducibilidad son la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas realizadas en un periodo corto de tiempo, estas mediciones son realizadas con el mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición, el mismo lugar y las mismas condiciones de medición, mientras que en la reproducibilidad uno o varios de estos ítems cambia. La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando, ya que la imperfección natural de la realización de las mediciones, hace imposible conocer con certeza absoluta el valor verdadero de una magnitud (Schmid y Lazos, 2000).

Otro parámetro de interés es la robustez, que es una medida de la efectividad y el desempeño de un método analítico aun sin realizar una implementación perfecta de este; su importancia radica en que pueden haber algunas etapas del método

que si no se desarrollan con suficiente control tendrán un efecto severo sobre el método (Guía Eurachem, 2005); es decir, un método analítico es robusto si los resultados no son muy sensibles a las variaciones en las condiciones experimentales (Zagal y Sadzawka, 2007).

El objetivo del presente trabajo fue validar los protocolos para evaluación seminal del test de penetración *in vitro* de ovocitos inmaduros y del test de fragmentación del ADN espermático, para incorporarlos a la rutina de evaluación de semen porcino del Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad de Caldas.

Materiales y métodos

El material utilizado en este estudio fue una muestra de semen diluido y refrigerado de cerdo, preparada en cada granja y transportada al laboratorio de acuerdo con sus propios protocolos. Los criterios básicos aplicados fueron: dosis seminales de 80 a 100 ml con $2,5-3 \times 10^9$ células, empacadas en recipientes plásticos estériles bien cerrados y completamente identificados, refrigeradas entre 15°C a $17,7^{\circ}\text{C}$, y enviadas al laboratorio inmediatamente después de procesadas.

Valoración de la integridad del ADN mediante el Kit comercial Sperm-sus-Halomax® (ChromaCell SL, Madrid, España)

La muestra de semen se diluyó en BTS (Beltsville Thawing Solution) hasta una concentración final de 5 a 10×10^6 espermatozoides/ml, después, se fundió la agarosa, ubicando el vial con este reactivo en un baño maría entre 90 y 100°C durante 5 minutos, se retiró y se atemperó en un baño María a 37°C durante 5 minutos. Seguidamente, se agregaron $25\mu\text{l}$ de semen diluido al vial con la agarosa fundida y se mezcló mediante agitación en vortex, se depositaron $25\mu\text{l}$ de la mezcla en un portaobjetos pretratado ubicado en posición horizontal, se cubrió con una laminilla (presionando suavemente sin hacer burbujas de aire) e inmediatamente se llevó la preparación a 4°C durante 5 minutos, ubicándola en una placa de vidrio o de metal, para solidificar la muestra. Luego se removió la laminilla deslizándola con la yema del dedo, se sumergió horizontalmente el portaobjetos en 10 ml de solución de lisis a 22°C , se incubó a igual temperatura durante 5 minutos en cabina extractora y se trasladó con ayuda de pinzas y guantes a una bandeja de plástico con agua tipo III para lavar durante 5 minutos, con el fin de remover los residuos de solución de lisis. Después de lavar, se procedió a deshidratar la preparación en posición horizontal, mediante inmersiones sucesivas, de dos minutos cada una, en etanol al 70%, 90% y 100%,



y se dejó secar al aire libre. Esta preparación, se coloreó en posición horizontal cubriéndola con 3ml de colorante de Wright diluido 1:1 en solución salina fosfato bufferada (PBS, de su nombre en inglés Phosphate Buffered Saline) durante 15 minutos, luego se lavó brevemente con abundante agua tipo III para eliminar el exceso de solución y se realizó un secado al aire libre. La calidad de la preparación se evaluó en microscopio de campo claro con objetivo de 40x, con el fin de establecer la necesidad o no de reforzar la tinción o de suavizarla mediante lavado con agua tipo III.

La evaluación se realizó mediante el conteo de 500 espermatozoides en un microscopio de campo claro a 40x, según los siguientes criterios: espermatozoides con ADN fragmentado, aquellos cuyo núcleo posee un halo con un espesor igual o mayor a su diámetro menor; y espermatozoides con ADN sin fragmentar, aquellos cuyo núcleo no posee halo o cuando el espesor del halo es menor a la tercera parte de su diámetro menor. Se calculó el índice de fragmentación del ADN o el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado.

Valoración de la tasa de penetración mediante el Test de penetración *in vitro* con ovocitos inmaduros

Los medios y las soluciones se prepararon el día antes de su utilización, el pesaje de reactivos se realizó en balanza analítica y se utilizó agua tipo I. El pH se ajustó con adición de NaOH 1N y HCl 1N, la esterilización se realizó por filtración a través de membranas de 0.22 micras de diámetro de poro en cabina de flujo laminar, y se conservan a 4°C en frascos estériles y sellados. La composición de los medios fue igual a lo recomendado por Gadea (1997) Tabla 1. La solución de transporte de ovarios fue solución salina fisiológica preparada en una proporción de 9 g de cloruro de sodio en un litro de agua (NaCl al 0,9%) suplementada con 70 mg de sulfato de kanamicina.

El PBS Dulbecco's (DPBS) se preparó de la siguiente manera: solución 1, con 8,032 g de NaCl, 0,201 g de KCl, 1,25 g de Na₂HPO₄, 0,204 g de KH₂PO₄ y 800 ml de agua; solución 2, con 0,107 g de CaCl₂ y 100 ml de agua; y solución 3, con 0,102 g de MgCl₂.6H₂O. Las tres soluciones se esterilizaron en autoclave a 1 kg/cm² (15 psi) y 121°C, y se mezclaron cuando estuvieron a temperatura ambiente.

Tabla 1. Medios utilizados en el test de penetración *in vitro* con ovocitos inmaduros

	Medio de lavado de ovocitos o mDPBS ¹		Medio de suspensión espermática.		Medio de co-incubación.	
Medio base	DPBS		Medio 199 con sales de Earle's		Medio de suspensión espermática	
Suplementos en g/L (ajustado con el grado de pureza del reactivo)	BSA ² ≥ 96%	4,1666	FSC inactivado ³	120mL/L v/v	Cafeina ≥50%	0,7767
	Piruvato de sodio ≥ 99%	0,0378	D-glucosa	0,5495	Lactato de calcio ≥ 85%	1,3863
	D-glucosa	0,9981	Piruvato de sodio ≥99%	0,1011		
	Kanamicina	0,07	Lactato de calcio ≥ 85%	0,7496		
			Penicilina G potásica	0,0297 (50.000UI/L)		
		Sulfato estreptomina de	0,03			
pH	7,4		7,8		7,4	

¹DPBS=Solución salina fosfato buferada Dulbecco's modificada; ²BSA= Albumina sérica bovina; ³FSC=Suero de ternero bovino inactivado.

Se colectaron ovarios de cerda prepuber inmediatamente después del sacrificio, con guantes y tijeras estériles, se depositaron en un termo, se cubrieron con solución para transporte de ovarios a 37°C y se llevaron al laboratorio durante los 30-60 minutos siguientes a la colección. En el laboratorio, se eliminó los restos del ligamento suspensorio, se lavaron los ovarios dos veces con solución para transporte de ovarios a 37°C y se almacenaron máximo 2 horas en un recipiente estéril con solución DPBS modificada a 37°C. Luego se colectó el fluido folicular de folículos de 3 a 6 mm de diámetro, mediante aspiración con aguja calibre 18 conectada a una jeringa de 10 ml, se dejó sedimentar en un tubo falcon de 15 ml en baño maría a 37°C, durante 15 minutos, y el sedimento compuesto por ovocitos y células foliculares se dispuso en una caja de Petri de 100 mm, previamente adicionada con medio de lavado de ovocitos, a 37°C.

Se seleccionaron los ovocitos con citoplasma uniforme y rodeados por lo menos de dos capas de células del cúmulus con estereoscopio y placa térmica a 37°C, entre 20 y 50 aumentos, se transfirieron de 10 a 15 ovocitos con una pipeta



Pasteur de punta extendida a una caja de Petri de 35 mm con 2 ml de medio de co-incubación previamente gasificado mínimo durante una hora en 5 % de CO₂.

En la Preparación del semen y co-incubación, se centrifugaron 20 ml de semen diluido en un tubo falcon de 50 ml, a 100 g durante 3 minutos; se eliminó el sedimento y se centrifugó nuevamente el sobrenadante a 1200 g por 3 min. El diluyente resultante se diluyó en medio de suspensión espermática, hasta alcanzar una concentración de 200×10^6 espermatozoides/ml, se depositaron 100 μ l de la solución espermática a cada caja de Petri con los ovocitos en medio de co-incubación hasta alcanzar una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/ml y se incubó durante 16 a 18 horas, a 39°C, en una atmósfera del 5% de CO₂ y humedad a saturación.

Para la fijación, coloración y visualización; después del periodo de co-incubación los ovocitos se trasladaron a medio de lavado de ovocitos y se realizaron sucesivos pases a través de una pipeta durante 5 minutos, con el fin de eliminar de forma mecánica las células del cúmulo oophorus y los espermatozoides adheridos superficialmente. Seguidamente, se colocaron dos líneas finas de vaselina en un portaobjetos con una jeringa de 2 ml y aguja calibre 18, en dirección del eje mayor y cerca al borde de la lámina; se depositaron los ovocitos, en una gota de medio de lavado de ovocitos entre ambas líneas de vaselina, con la ayuda de una pipeta Pasteur de punta extendida, se puso una laminilla sobre el portaobjetos hasta hacer contacto con la gota, se depositó solución fijadora compuesta por una dilución 3:1 de etanol absoluto y ácido acético glacial, de manera que el líquido entrara por capilaridad entre la laminilla y el portaobjetos, se introdujo el portaobjetos suavemente, en un recipiente con solución fijadora y se dejó a temperatura ambiente durante 48-72 horas. Luego se sacaron las placas lentamente, se secó el exceso de solución fijadora y se tiñeron con Lacmoid al 1% disuelto en una solución de ácido acético al 45% en agua tipo III, dejando que el colorante entrara por capilaridad. Finalmente, se observó la preparación en microscopio de contraste de fases a 40x y se contaron como ovocitos penetrados aquellos que tenían espermatozoides completos y ligeramente descondensados en el interior de su citoplasma y espermatozoides con colas rectas y ligeramente separadas de la cabeza en el interior del citoplasma. Se calculó la tasa de penetración como porcentaje de ovocitos penetrados.



Proceso de validación

Repetibilidad

Se analizaron 7 muestras, para cada técnica, en condiciones homogéneas en lo relativo a: analista, método, equipo y laboratorio, en periodos cortos de tiempo. Los datos fueron analizados mediante el método de medias y rangos (MR) para determinar la consistencia del proceso de medición.

Reproducibilidad

Se analizaron 7 muestras para cada técnica, en condiciones homogéneas en lo relativo a: método, equipo y laboratorio, en periodos cortos de tiempo, y se cambió la condición "analista". Para tal efecto, el método se ejecutó por tres analistas que procesaron tres alícuotas de cada muestra; los cuales desconocían la identificación original de la muestra y de las alícuotas preparadas.

El estudio se planteó como un arreglo factorial de un solo factor con tres réplicas, en un diseño experimental completamente al azar, para establecer el efecto de analista. Se tomó como factor el analista en tres niveles y las variables dependientes fueron: el IDF en el caso del test de fragmentación del ADN espermático (TFAE), y la tasa de penetración en el caso del test de penetración con ovocitos inmaduros (TPIVOI). Finalmente, se realizó análisis de varianza unidireccional y las pruebas de variabilidad de residuales, de Bartlett y de Levene.

El modelo experimental fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde: μ = media general, T_i = efecto del i -ésimo analista y ϵ_{ij} = error aleatorio $\sim N(0, \sigma^2)$.

R&R

Se evaluaron aleatoriamente tres alícuotas de 7 muestras, por 3 analistas que desconocían la identificación original de la muestra y de las alícuotas preparadas.

Se planteó un estudio R&R cruzado mediante un arreglo factorial 7x3 (siete muestras y tres analistas) en un diseño completamente al azar con tres replicas por tratamiento; y las variables dependientes fueron: el IDF en el caso TFAE y la tasa de penetración en el caso del TPIVOI. Se realizó un análisis de varianza, con énfasis en la interacción muestra por analista. Adicionalmente, se calculó el



porcentaje de contribución de cada uno de los componentes de variación: repetibilidad, reproducibilidad, la variación muestra a muestra y el R&R, a la variación total y al porcentaje de variación del estudio. Esta última variación se calculó de la siguiente manera: DE de cada uno de los componentes $\times 6 \times 100/\%$ de variación total.

El modelo experimental fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde: y_{ijk} = IDF o tasa de penetración (según la técnica en prueba) obtenida de la k-ésima replicación de la i-ésima muestra por el j-ésimo analista, μ = media general, α_i = efecto de la i-ésima muestra, β_j = efecto del j-ésimo analista, $\alpha\beta_{ij}$ = efecto de la interacción de la i-ésima muestra con el j-ésimo analista y ϵ_{ijk} = error aleatorio $\sim N(0, \sigma^2)$.

Los criterios de decisión fueron los siguientes:

- Si el sistema de medición representa menor al 10% de la variación del estudio, se considera aceptable.
- Si el sistema de medición representa entre el 10 y el 30% de la variación del estudio, se considera potencialmente aceptable.
- Si el sistema de medición representa mayor al 30% de la variación del estudio, se considera inaceptable.

Robustez

La robustez se determinó mediante la metodología de Youden y Steiner (1975), para determinar el efecto de la variación de 7 factores del protocolo original, así: se tomó el protocolo original como control y 7 protocolos nuevos, y la distribución de los 7 factores modificados se realizó según la Tabla 2, tomando las letras mayúsculas como las etapas originales y las letras minúsculas como la variación correspondiente.

Tabla 2. Factores originales del TPIVOI y del TFAE su respectiva modificación y la distribución en 8 protocolos

TPIVOI			TFAE			Protocolos							
Factor	Real	Variación	Factor	Real	Variación	1	2	3	4	5	6	7	8
pH del medio de coincubación	A: 7,4	a: 5	Homogenizar muestra antes	A: si	a: no	A	A	A	A	a	a	a	a
Concentración del semen en medio de suspensión espermatoca	B: 200x10 ⁶ /ml	b: 75x10 ⁶ /ml	Concentración del semen	B: 5 a 10x10 ⁶ /ml	b: 30x10 ⁶ /ml	B	B	b	b	B	B	b	b
Volumen de semen para coincubar	C: 100µl	c: 10µl	refrigeración	C: 5 min	c: 1 min	C	c	C	c	C	c	C	c
Tiempo de coincubación	D: 18 horas	d: 4 horas	Tiempo en solución de lisis	D: 5 min	d: 1 min	D	D	d	d	d	d	D	D
Desnudar ovocitos	E: si	e: no	Deshidratación en alcoholes	E: si	e: no	E	e	E	e	e	E	e	E
Tiempo de fijación	F: 72 horas	f: 12 horas	Concentración del colorante	F: 100%	f: 25%	F	f	f	F	F	f	f	F
Concentración de Lacmoid	G: 1%	g: 4%	recuento	G: 300	g: 50	G	g	g	G	g	G	G	g

Las variables dependientes fueron: el IDF en el caso del TFAE y la tasa de penetración en el caso del TPIVOI; entonces, para determinar el efecto de la variación de cada uno de los factores, se analizaron cada uno de los 8 protocolos, obteniendo 8 resultados, y se promediaron los cuatro resultados en los que el factor se mantuvo como original (letras mayúsculas) y los cuatro resultados en los que el factor varió (letras minúsculas); y finalmente se calculó la diferencia entre el promedio del factor original y el promedio del factor variado.

El criterio de análisis fue el siguiente: si la diferencia obtenida para cada uno de los factores fue menor que $V \times DE$, siendo V una constante que equivale a 1,4 y DE la desviación estándar obtenida luego de realizar el protocolo original 10 veces en condiciones de repetibilidad, se afirma que el método es robusto ante los cambios operacionales efectuados; sino, estas variables recibirán especial atención al redactar el método, necesitando un estricto control para obtener resultados válidos.

Incertidumbre

La incertidumbre se determinó por análisis de las siguientes fuentes de incertidumbre: efectos de los equipos e instrumentos, efectos de los reactivos, efectos de la muestra y efectos de los analistas. Se calcularon las incertidumbres tipo A, tipo B, combinada y expandida de la siguiente manera: la incertidumbre tipo A mediante el análisis estadístico de 10 análisis de cada técnica a en condiciones de repetibilidad, utilizando la DE (de los 10 resultados)/raíz cuadrada de n; la incertidumbre tipo B se estimó a partir de certificados de calibración de los equipos, especificaciones y datos del fabricante, mediante la fórmula: $U_B = U$ reportada en certificado / $\sqrt{3}$; la incertidumbre combinada se halló con la fórmula: $U_C = \sqrt{U_A^2 + U_B^2}$; y finalmente, la incertidumbre expandida con la fórmula: $U_E = K * U_C$, donde: $K = 2$ factor de seguridad, con una confianza del 95,44% para una distribución normal.

Después de conocer la incertidumbre de cada método, el resultado final se reportará de la siguiente manera: X resultado del análisis $\pm U_E$, es decir, el valor verdadero del análisis efectuado (X) que se encontrará con alta probabilidad en el intervalo: ($X + U_E$; $X - U_E$).

El análisis de los datos y la obtención de las gráficas de los parámetros de validación analizados se realizaron usando el programa estadístico Minitab®.

Resultados y discusión

En la técnica del TFAE se obtuvieron preparaciones que permitían una clara diferenciación de los niveles de fragmentación del ADN de los espermatozoides luego del tratamiento de desproteización Fig. 1, y en la técnica del TPIVOI se obtuvieron preparaciones donde se apreció los espermatozoides que penetraron luego de la co-incubación con los ovocitos, la fijación y la coloración con Lacmoid al 1% Fig. 2.

Figura 1: Niveles de fragmentación del ADN espermático, visualización luego de tinción con Wright en microscopio de campo claro a 40x.

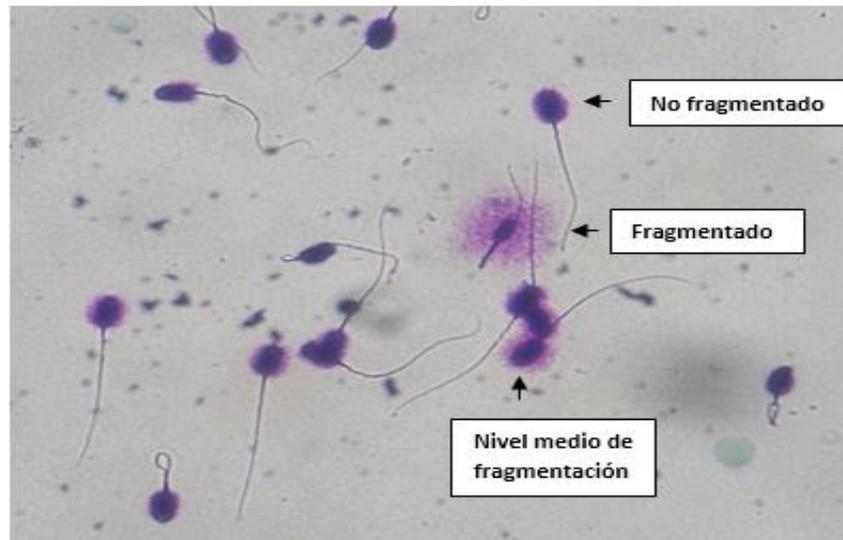
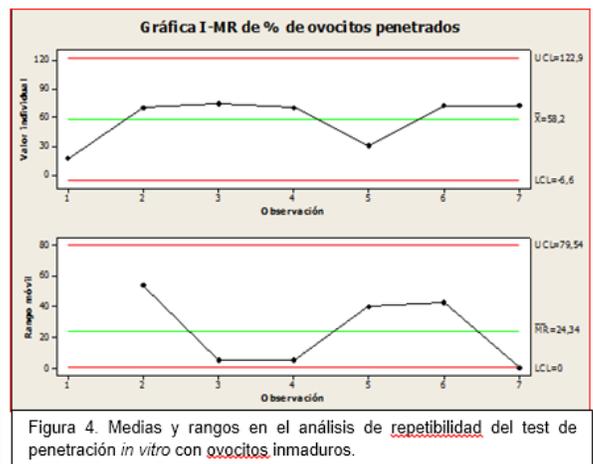
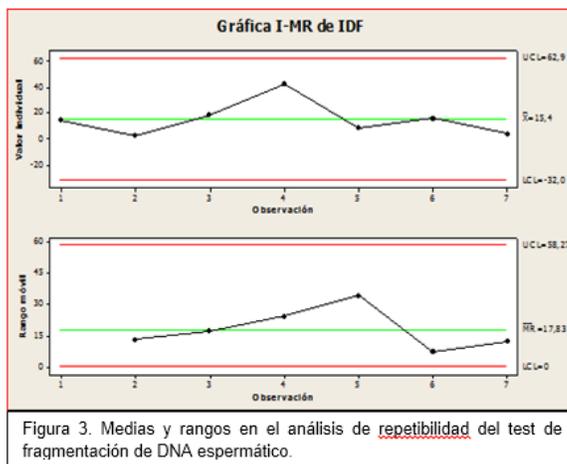


Figura 2: Ovocito inmaduro con espermatozoides dentro de su citoplasma, visualización, luego de tinción con Lacmoid al 1%. Flecha: espermatozoide penetrado con cola recta y ligeramente separada de la cabeza.



En el análisis de repetibilidad por el método de medias y rangos, para ambas técnicas, se encontró que los valores registrados presentaron una dispersión moderada desde la media y estuvieron dentro del límite de control inferior y superior. Sin embargo, la observación siete del TPIVOI se encuentra sobre el límite de control inferior, evidenciando que la uniformidad de la medición, puede ser perfeccionada Fig. 3 y 4, lo anterior indica que siguiendo el instructivo de ambos métodos se obtuvo uniformidad de la medición, variabilidad bajo control y resultados consistentes en condiciones de repetibilidad.



En el análisis de reproducibilidad, el efecto del factor analista no fue significativo ($P > 0,05$) en ambas técnicas Tabla 3, por tanto, se puede concluir que el TFAE y el TPIVOI, no son afectados por el analista que los realice. En razón del resultado anterior, no hay necesidad de realizar las comparaciones de medias.

Tabla 3. Efecto del analista en la reproducibilidad del test de fragmentación del ADN espermático (A) y del test de penetración *in vitro* con ovocitos inmaduros (B) por análisis de varianza.

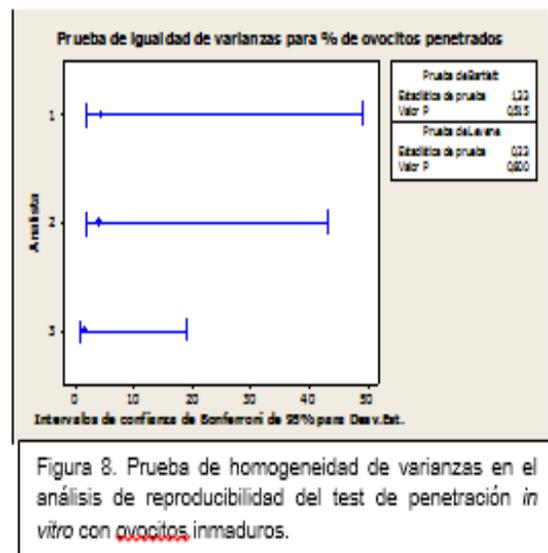
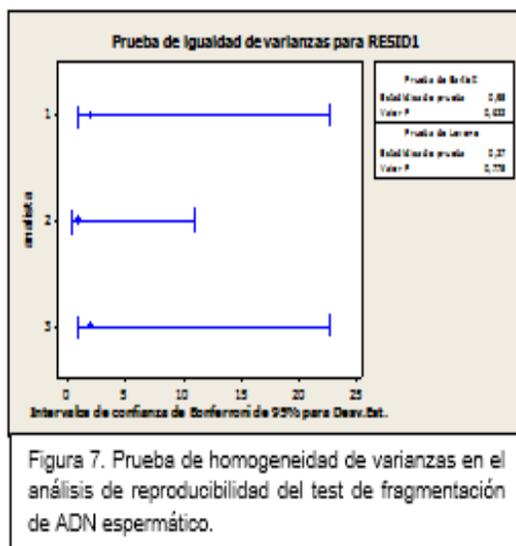
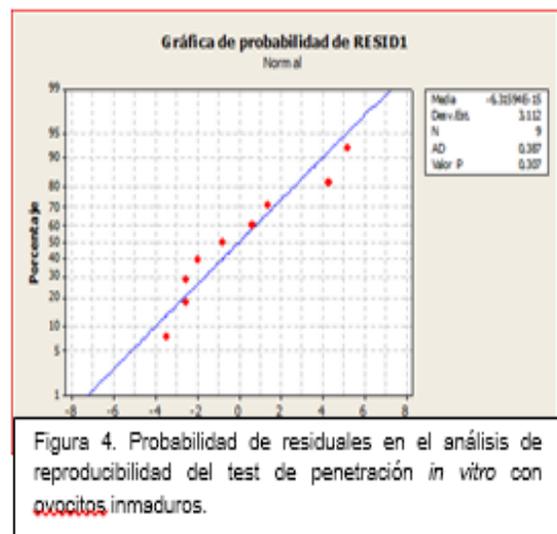
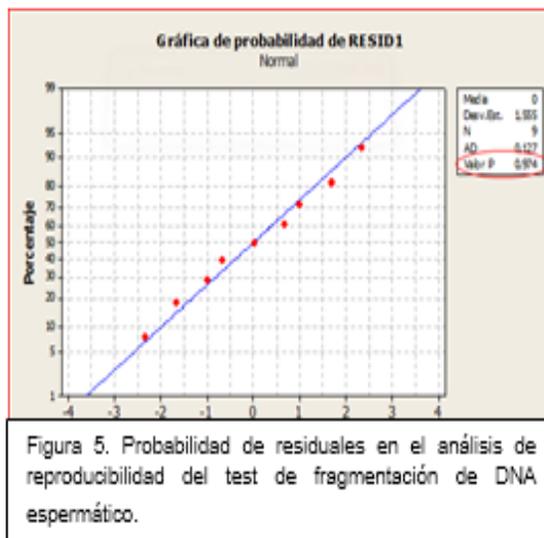
A)

FV	GL	SC	CM	F	P
Analista	2	24,67	12,33	3,83	0,085
Error	6	19,33	3,22		
Total	8	44,00			

B)

FV	GL	SC	CM	F	P
Analista	2	40,2	20,1	1,56	0,285
Error	6	77,5	12,9		
Total	8	117,6			

En el análisis de probabilidad de residuales para el modelo anterior, se observó que los datos seguían la línea de tendencia con una distribución normal **Fig. 5 y 4**, de igual manera, se encontró un valor de $P > 0,05$ en las pruebas de Bartlett y de Levene, que indica que las varianzas cumplen el supuesto de distribución normal, con un intervalo de confianza de 95% para la DE **Fig. 7 y 8**, lo cual demuestra que el modelo adoptado ajusta correctamente los datos.



En el análisis de R&R cruzado, para ambas técnicas: la interacción muestra x analista no fue significativa ($P > 0,05$), se encontró efecto altamente significativo ($P \leq 0,01$) de las muestras y efecto no significativo de los analistas ($P > 0,05$) sobre los resultados de cada técnica Tabla 4. Esto se muestra en las gráficas por muestras donde los promedios están agrupados uniformemente y se aprecia las diferencias entre muestras, y en la gráfica por analistas la línea que une los promedios se encuentra paralela al eje X, mostrando que los tres analistas tienen mediciones uniformes Fig. 9 y 10. En concordancia con lo anterior, el comportamiento del sistema de medición de ambas técnicas es apropiado, debido a que las diferencias entre muestra y muestra explican la mayoría de la variabilidad de las técnicas, con un porcentaje de contribución de 96,51% para el TFAE y de 97,53% para el TPIVOI, y la variabilidad resultante de la repetibilidad y de la reproducibilidad son bajas: 3,49 % para repetibilidad y 0% para reproducibilidad en el TFAE; 1,47% para repetibilidad y 0,9% para reproducibilidad en el TPIVOI Fig. 9 y 10.

Tabla 4. Efecto de muestras y analistas sobre el R&R del sistema de medición del test de fragmentación del ADN espermático (A) y del test de penetración *in vitro* con ovocitos inmaduros (B) por análisis de varianza.

A)

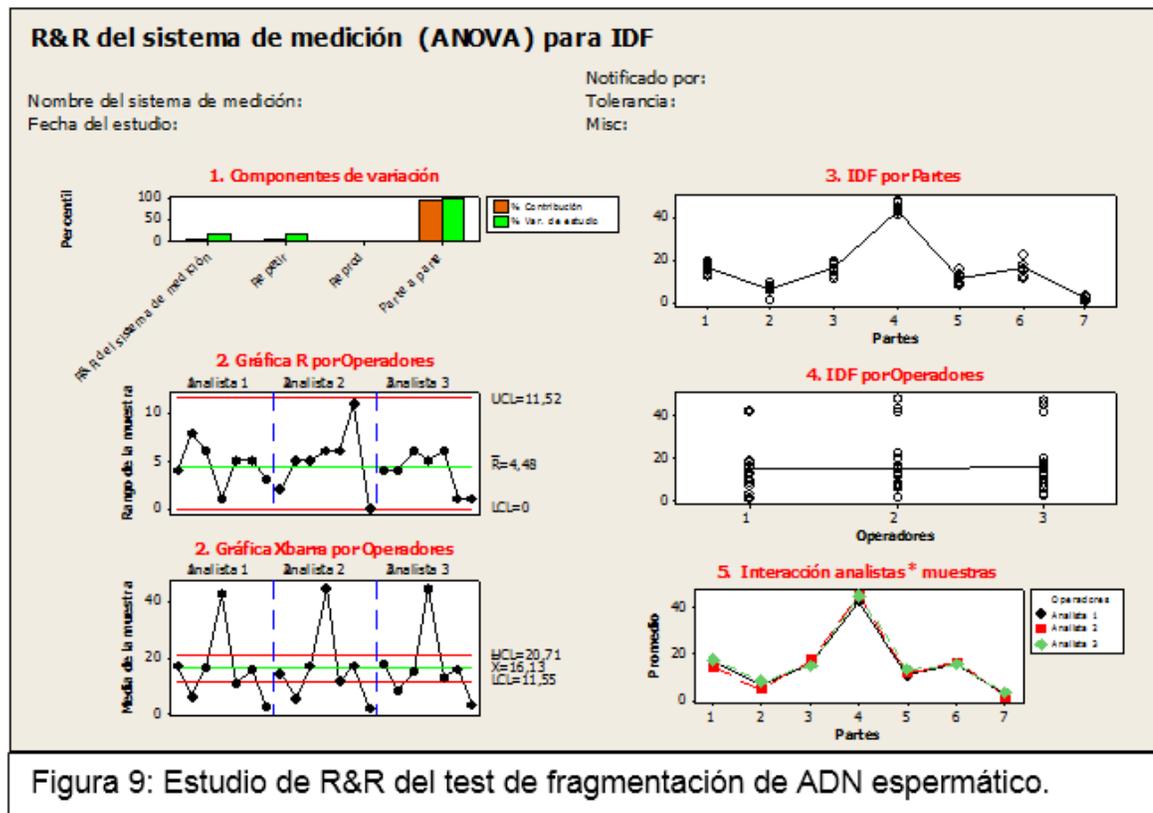
FV	GL	SC	CM	F	P
Muestras	6	9673,7	1612,28	346,864	0,000
Analista	2	10,9	5,44	1,171	0,343
Muestras * Analistas	12	55,8	4,65	0,667	0,772
<u>Repetibilidad</u>	42	292,7	6,97		
Total	62	10033			

B)

FV	GL	SC	CM	F	P
Muestras	6	35954,5	5992,42	212,163	0,000
Analista	2	31,6	15,81	0,560	0,586
Muestras * Analistas	12	338,9	28,24	2,824	0,006
<u>Repetibilidad</u>	42	420,1	10,00		
Total	62	36745,1			

Los valores obtenidos en el TFAE y en el TPIVOI en la prueba R&R, representaron una variación del estudio del 18,68 y del 15,39% respectivamente Fig. 9 y 10; lo cual, según los criterios de R&R el sistema de medición, ambas técnicas son potencialmente aceptables. Así mismo, el porcentaje de variación muestra a muestra en ambas técnicas fue mayor que el 70%, con 98,24% para el TFAE y de 98,81% para el TPIVOI, este hallazgo también es representado en la gráfica de Xbarra Fig. 9 y 10, donde la mayoría de valores de las muestras se encuentran por

fuera de los límites superior e inferior, lo que demuestra que el sistema de medición puede detectar altas diferencias de una muestra a otra



En el análisis de robustez, los factores evaluados, en ambos métodos presentan efecto significativo, sobre el método original, razón por la cual, son punto de control al momento de realizar el TPIVOI y el TFAE, en el Laboratorio de Biología de la Reproducción, el control se realiza cumpliendo el método original, sin variaciones en su implementación.

En la estimación de la incertidumbre expandida de ambos métodos, indica que los resultados se encuentran realmente en un intervalo de ± 1 . Es decir que los resultados \bar{X} de IDF y tasa de penetración deberán ser reportados como $\bar{X} \pm 1$.

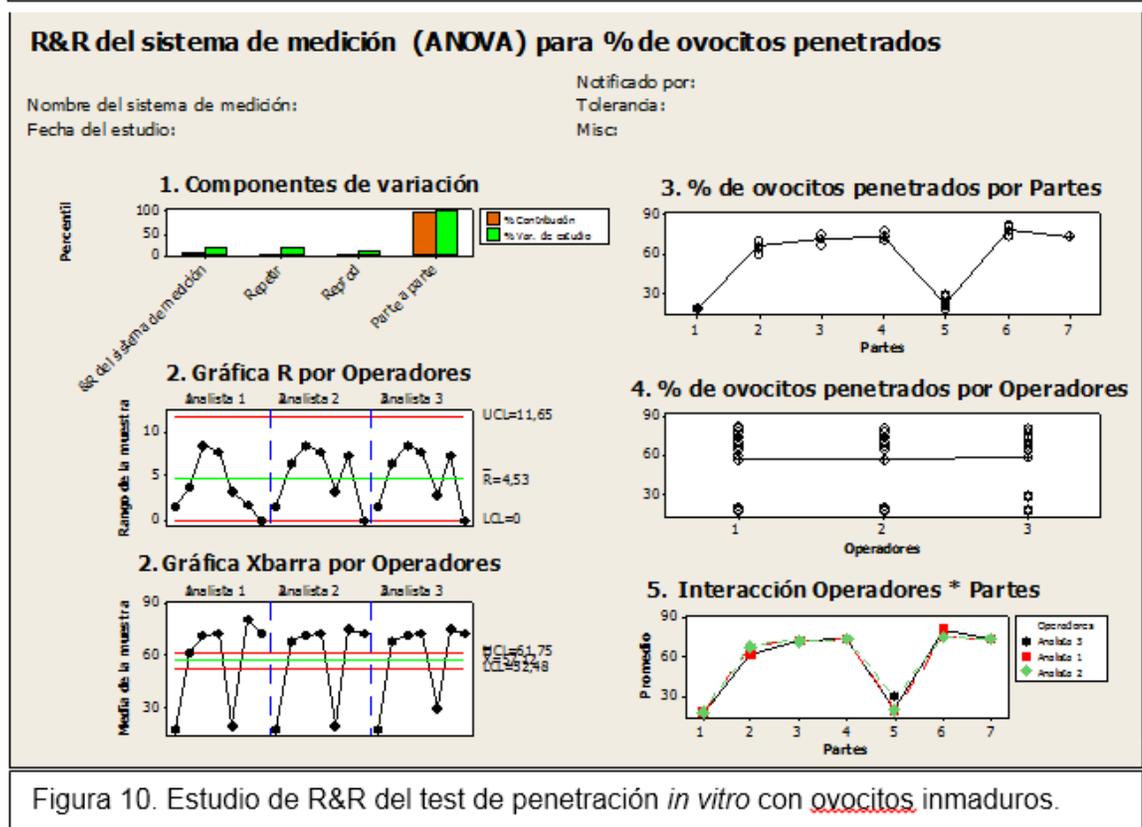


Figura 10. Estudio de R&R del test de penetración *in vitro* con ovocitos inmaduros.

Conclusiones

Los dos métodos *in vitro* para evaluación de la calidad seminal de semen porcino, utilizados en el laboratorio de Biología de la Reproducción, son consistentes, no son afectados por el analista, son adecuado en relación de R&R, se establecieron condiciones de análisis en robustez y su incertidumbre es conocida; razón por la cual son conformes para su uso en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad de Caldas.

Con el desarrollo de este trabajo se establecieron medidas de control que favorecen la adopción de la Norma Internacional ISO/IEC 17025:2005 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y/o calibración), y de esta manera acceder a la acreditación de los análisis realizados en el laboratorio. La incorporación de los dos métodos como técnicas de alta resolución, constituye un avance considerable en la evaluación de la calidad seminal en la producción porcina colombiana.



Bibliografía

Boe-Hansen G.B., Christensen P., Vibjerg D., Nielsen M.B.F. y Hedeboe A.M. (2008). Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*. 69: 728-736.

Braundmeier A.G. y Miller D.J. (2001). The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J. Dairy Sci.* 84: 1915-1925.

Braundmeier G., Demers J.M., Shanks R.D. y Miller D.J. (2004). The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. *J. Anim. Sci.* 82: 452-458.

Diaz O. Mesa H., Gómez G. y Henao F.J. (2008). Evaluación in vitro de la viabilidad del semen porcino hasta 120 horas de almacenamiento en refrigeración. *Vet. Zootec.* 3(1) 32-37.

Enciso M. López-Fernández C., Fernández J.P., García P., Gosálbez A. y Gosálbez J. (2006). A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*. 65: 308-316.

Enciso M. (2009). La fragmentación del AND en espermatozoides de mamíferos. (Tesis doctoral) Universidad Autónoma de Madrid. España.

Eurachem. (2005). The Fitness for Purpose of Analytical Methods a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Secretaria Tteddigton, Middlesex. CNM-MRD-PT-030.

Gadea, J. (1997). Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vitro". (Tesis doctoral). Universidad de Murcia. España

Gadea, J., Matas C., y Lucas X. (1998). Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration hIVP/ assay. *Animal Reproduction Science*. 56: 95-108.

Gadea, J., y Matas C. (2000). Sperm Factors Related To In Vitro Penetration Of Porcine Oocytes. *Theriogenology*. 54: 1343-1357.

Henao, F.J., Díaz O. Valencia J.G., y Bedoya L.P. (2007). Evaluación de la calidad seminal en los porcinos. *Porcicultura colombiana*. Vol.109.



Martinez, E.A., Vazquez J. M., Matas C., Gadea J., Alonso M.I., Roca J. (1996). Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro capacitation treatments. *Biology of reproduction*. 55: 134-140

Martínez, E.A., Vazquez J.M., Roca J., Blanco O., Lucas X., Matasand C., Gil M.A. (1998). Relationship between homologous In vitro penetration assay and boar semen fertility. *Theriogenology*. 371.

Pérez-Llano, B., Enciso M., García-Casado P., Sala R., y Gosálvez J. (2006). Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology*. 66: 2137-2143.

Pérez-Llano, B., C. López-Fernández, P. García-Casado, F. Arroyo, A. Gosalbez, R. Sala, and J. Gosálvez. (2010). Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: Ejaculate and temperature effects. *Animal Reproduction Science*. 119: 235-243.

Schmid W. y Lazos, R.J. (2000). Guía para estimar la incertidumbre de la medición. Centro Nacional de Metrología.

Seli, E., Gardner D.K., Schoolcraft, Moffatt W.B., O. y Sakkas, D. (2004) Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. Vol. 82 (2).

Xu, X., Pommier S., Arbov S, Hutchings S., Sotto W., y. Foxcroft G.R. (1998). In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim. Sci*. 76: 3079–3089.

Youden, W.J. y Steiner E.H. (1975). *Statistical Manual of AOAC*. Assoc. Official Analytical Chemists, Washington. D.C

Zagal, E., Sadzawka R. (2007). Implementación del sistema para la validación de los métodos de análisis y mediciones de laboratorio en suelos y lodos. Universidad de Concepción Facultad de Agronomía Chillán.