



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**EFECTO DEL SUSTRATO ENERGÉTICO EN EL DILUYENTE
DURANTE LA REFRIGERACIÓN SOBRE LA CALIDAD DEL
SEMEN DE CAPRINO**

Carmen Gozalbo Sánchez

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Ricardo Román Cordero Otero; Biología; Bioquímica i Biotecnologia; ricardo.cordero@urv.cat

En cooperació amb: Universitat de València

Supervisor: Miguel Ángel Silvestre Camps; Biología; Biología celular, Biología Funcional y Antropología Física; miguel.silvestre@uv.es

Junio 2023

Yo, Carmen Gozalbo Sánchez, con DNI 54283812V, soy concedora de la guía de prevención del plagio de la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio 2017) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 7 de Junio de 2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carmen', with a horizontal line extending to the right from the end of the name.

ÍNDICE

DATOS DEL CENTRO	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	5
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3. METODOLOGÍA	11
3.1 MEDIOS Y REACTIVOS	11
3.2 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE SEMEN.....	11
3.3 MOTILIDAD (CASA).....	12
3.4 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	13
3.4.1 Viabilidad.....	14
3.4.2 Potencial de membrana mitocondrial.....	15
3.4.3 Presencia de ROS mitocondrial.....	15
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
4. RESULTADOS	17
4.1 EFECTO DE LA CONSERVACIÓN SEMINAL A DIFERENTES TIEMPOS Y SUSTRATOS SOBRE LA MOTILIDAD Y CINÉTICA DE LOS ESPERMATOZOIDES	17
4.2 EFECTO DE LA CONSERVACIÓN SEMINAL A DIFERENTES TIEMPOS Y SUSTRATOS SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL, VIABILIDAD Y RESPUESTA OXIDATIVA .	19
4.3 EFECTO DEL TIEMPO EN LOS DIFERENTES PARÁMETROS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA SEGÚN EL SUSTRATO	20
4.4 EFECTO DEL TIEMPO EN LOS DIFERENTES PARÁMETROS DE FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y VIABILIDAD SEGÚN EL SUSTRATO	22
5. DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	27
AUTOEVALUACIÓN	29

DATOS DEL CENTRO

La Universidad de Valencia, fundada en 1499, es una de las universidades públicas más antiguas de España. Una amplia actividad docente e investigadora desarrollada en todas las áreas de conocimiento (ciencias básicas y experimentales, ciencias de la salud, ciencias de la educación, humanidades y ciencias sociales, económicas y jurídicas) y el compromiso con la excelencia la han convertido en una universidad moderna líder en la aplicación de nuevas tecnologías y conectada con las principales redes internacionales científicas.

Se sitúa entre las cuatro universidades más destacadas de España en el campo de la I+D+i, contando con 18 Institutos Universitarios de Investigación, investigación a través de los departamentos académicos de cada Facultad, y el Parque Científico de la Universidad de Valencia (PCUV) donde se transfiere el conocimiento poniendo a la Universidad en contacto con empresas derivadas de la investigación y empresas externas.

La Universidad cuenta con cientos de grupos de investigación registrados, uno de ellos es BIOTSPERM, grupo en el que he participado para llevar a cabo el experimento presentado en el siguiente trabajo. El grupo trata diferentes líneas de investigación en el ámbito de la biotecnología de la reproducción tanto en sus aspectos más básicos (activación oocitaria o morfometría espermática) como tecnológicos (Inseminación artificial, criopreservación) y tanto en la hembra (maduración oocitaria) como en el macho (conservación de los espermatozoides). El grupo también es pionero en el diseño y la mejora de los sistemas CASA a nivel mundial.

El principal objetivo del grupo es estudiar la evolución de diferentes parámetros espermáticos relacionados con el metabolismo energético en diferentes condiciones fisiológicas, y colateralmente la optimización del análisis de los parámetros espermáticos y las técnicas de conservación del semen.

RESUMEN

La inseminación artificial (IA) es la técnica de reproducción asistida más usada en la ganadería. Normalmente, en caprino, se usa semen refrigerado, que posee mejores características que el congelado, pero el tiempo de conservación en condiciones de refrigeración sigue siendo limitado. Conociendo la bioenergética del semen caprino se pueden desarrollar protocolos con sustratos específicos para alargar la vida útil del espermatozoide, sin embargo, en cabras, se encontró poca literatura centrada en el efecto del sustrato energético durante el almacenamiento del semen refrigerado.

En el presente estudio se evalúa el efecto de los sustratos glucosa, fructosa lactato y piruvato sobre los parámetros de calidad espermática en semen refrigerado. La motilidad y cinética espermática se estudia con el sistema CASA-Mot, mientras que la viabilidad, potencial de membrana mitocondrial, presencia de ROS mitocondrial y estado del acrosoma se estudian mediante citometría de flujo a partir de muestras teñidas con M1(HOECHST, Yoduro de propidio, carboxifluoresceína) y muestras teñidas con M2 (DAPI, MitoTracker Deep Red, MitoSOX).

Se ha observado que los sustratos piruvato y lactato apoyan la motilidad de los espermatozoides y la función mitocondrial mejor que la glucosa y la fructosa, que requieren procesamiento a través de la glucólisis antes de estar disponible como piruvato en las mitocondrias. Por tanto, los mejores diluyentes para conservar espermatozoides caprinos a 17°C en PBS es el piruvato y la glucosa.

Palabras clave: parámetros de calidad espermática, motilidad espermática, viabilidad, refrigeración

1. INTRODUCCIÓN

Las ovejas y las cabras contribuyen significativamente a la producción mundial de alimentos y fibras, estos rumiantes poseen un papel muy importante en la economía de los países, contribuyendo con alrededor del 76 % de la biomasa ganadera mundial (de Figueiredo, 2020), por tanto, la cría estacional supone una restricción reproductiva que acarrea grandes pérdidas económicas, además de no mejorar la ganancia genética de las especies. Para solucionar estos problemas se ha fomentado la adaptación de las Técnicas de Reproducción Asistida (ARTs) (Amiridis, G. S, 2012).

Tradicionalmente, las ART incluyen la inseminación artificial (AI), la fecundación in vitro (IVF), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y la producción de embriones in vivo e in vitro. Aunque la mayoría de las ART se han desarrollado y aplicado en cabras, la adaptación comercial de estas técnicas, sobre todo la inseminación artificial, es menor que en el ganado bovino siendo el número total de embriones transferidos para especies bovinas y de pequeños rumiantes de 842.376 y 2086, respectivamente (Amiridis, G. S, 2012).

La inseminación artificial es la principal técnica utilizada en la ganadería debido a su bajo coste, ya que permite la fecundación de una gran cantidad de hembras a partir de una única muestra de semen, normalmente, de machos élite, para garantizar la mejora genética. Para que la técnica sea óptima la muestra de semen se debe analizar para garantizar que los parámetros de validación espermáticos son óptimos y, por tanto, la fecundación será exitosa.

El semen se puede almacenar mediante congelación o por refrigeración, normalmente se conserva mediante refrigeración ya que las dosis son más sencillas de manejar, y las tasas de fertilidad y viabilidad son más elevadas que las dosis de semen congelado, las dosis enfriadas requieren menos espermatozoides por dosis, lo que significa más dosis de IA por eyaculado, lo que hace que el costo de una dosis de IA refrigerada sea menor que el costo de una dosis congelada (Sadeghi, S., 2020).

La principal desventaja del semen refrigerado es el poco tiempo de vida útil, tiene que ser inseminado en un corto período de tiempo (1-12 h) de lo contrario se reduce la fertilidad lo que lo hace inviable para largos periodos de tiempo, así como para el transporte a largas distancias (Sadeghi, S., 2020). Además el semen enfriado sufre una disminución de la motilidad y la integridad estructural, acompañada de una disminución de la supervivencia en el tracto reproductivo femenino, reducción de la fertilidad y aumento de la pérdida embrionaria (Salvador, I., 2006).

Diferentes parámetros se han estudiado en bovino o equinos para aumentar la vida útil del semen refrigerado como, por ejemplo, la reducción de la concentración de espermatozoides, la temperatura de almacenamiento, las características de la cámara de conservación o el efecto de los diferentes sustratos; pero no se ha encontrado literatura sobre la conservación de semen caprino. Sería de gran interés desarrollar protocolos de conservación de semen caprino destinados a prolongar la fertilidad del semen refrigerado.

Tanto para la movilidad como para la reacción acrosómica, la hiperactivación y por lo tanto, la fertilización de los espermatozoides es necesario el ATP (Christa R. Darr, 2016). Las dos vías metabólicas principales por las cuales los espermatozoides consiguen energía en forma de ATP son la glucólisis (anaeróbica), que tiene lugar principalmente en la vaina fibrosa del flagelo; y la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), en las mitocondrias (localizadas exclusivamente en la pieza intermedia) (Fig 1).

Aunque son dos vías bien conocidas y estudiadas, la predominancia de vías energéticas del esperma puede variar en cada especie, y en semen caprino aún no está clara. Los medios de esperma para el almacenamiento y la refrigeración deben formularse teniendo en cuenta los requisitos energéticos específicos para dotar al espermatozoide de todo el ATP que necesite.

Por ejemplo, los espermatozoides equinos dependen casi por completo de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) para la producción de ATP, que se utiliza para la motilidad y otras funciones espermáticas por lo que es crucial proporcionar a los espermatozoides los sustratos necesarios para el metabolismo OXPHOS en una concentración que mejor apoye la eficiencia mitocondrial (Christa R. Darr, 2016).

En cuanto a espermatozoides caprinos, se ha propuesto la fosforilación oxidativa como vía principal de obtención de energía, principalmente, porque la glucólisis se caracteriza por un menor rendimiento de moléculas de ATP producidas por molécula de glucosa metabolizada, pero, las mitocondrias se localizan en la pieza intermedia por lo que se piensa que no hay tiempo suficiente como para que el ATP sea transportado a toda la extensión del flagelo, ya que este es el que realiza el movimiento.

El sustrato principal para la glucólisis es la glucosa, que se metaboliza a piruvato y/o lactato, la evidencia sugiere que el piruvato o el lactato podrían incorporarse fácilmente en la matriz mitocondrial, probablemente a través de lanzaderas de lactato o piruvato ubicadas en la membrana mitocondrial. Esto daría como resultado la producción de acetil-CoA y los transportadores NADH y FADH₂ requeridos para OXPHOS en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Hernández-Avilés, C., 2021). Por tanto, la adición de glucosa o fructosa le da al espermatozoide la capacidad de utilizar ambas vías, ya que no son vías alternativas, una vez metabolizado el sustrato en lactato y/o piruvato, estos entrarían en la

vía OXPHOS y un único sustrato produciría energía por ambas vías, pero, la adición de piruvato o lactato, metabolizados directamente por vía OXPHOS podrían mejorar la calidad del espermatozoide. Además, el piruvato y el lactato están presentes en altas concentraciones en el líquido oviductal (líquido presente en las trompas de Falopio) y, por lo tanto, los espermatozoides de los mamíferos los utilizan comúnmente como sustratos energéticos,

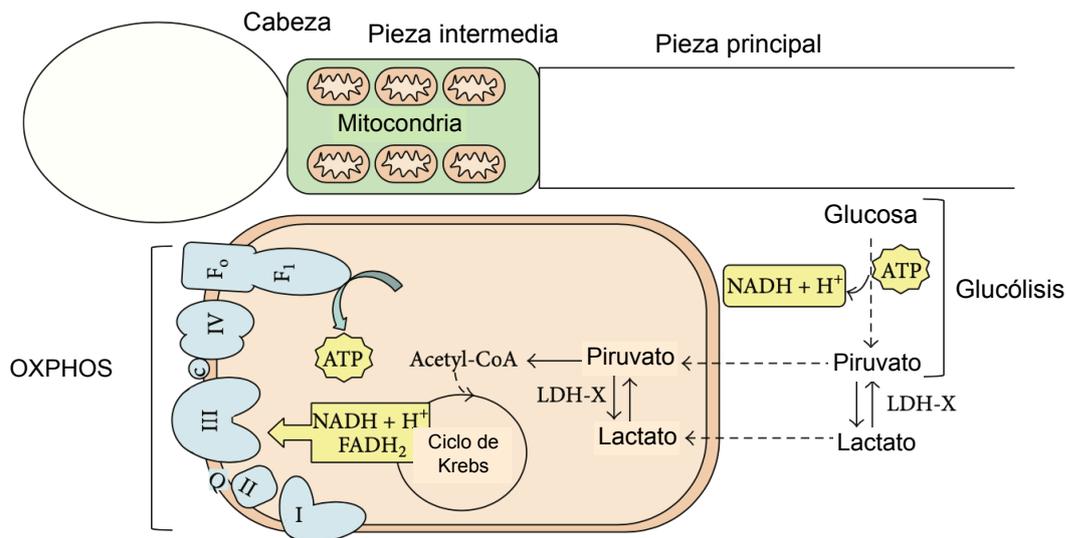


Figura 1. Compartimentación subcelular de OXPHOS y glucólisis en espermatozoides. El sistema OXPHOS está compuesto por cinco complejos multiméricos. El transporte de electrones del Complejo I al Complejo IV está acoplado a la síntesis de ATP. Los equivalentes reductores (NADH y FADH₂) producidos por la glucólisis y las reacciones del ciclo de Krebs se transfieren a la cadena de transporte de electrones unida a la membrana. c, citocromo c; Q, ubiquinona (Ferramosca, A., 2014).

La evaluación espermática es la técnica básica para predecir la fertilidad que puede resultar del uso de muestras de semen y, en consecuencia, para optimizar la producción de dosis a utilizar en inseminación artificial (Bompart et al., 2019a). En cuanto a los parámetros de validación espermáticos tanto la motilidad espermática como la cinética son las principales variables evaluadas en los centros y/o granjas de IA para calcular las dosis de IA (Del Gallego, R., 2017).

La motilidad de los espermatozoides se considera uno de los predictores de fertilidad más precisos y para evitar errores o limitaciones se hace uso del análisis asistido por computadora (CASA), los sistemas CASA consisten en una cámara de video acoplada a un

microscopio que permite obtener y enviar imágenes (o secuencias de imágenes) a una computadora para su análisis con un software especialmente diseñado.

El resultado de los sistemas CASA diseñados para análisis de motilidad (CASA-Mot system) incluye variables como los porcentajes de espermatozoides móviles totales y el cálculo de parámetros cinéticos como la velocidad de curvatura (VCL), que es la distancia total que recorre la cabeza del espermatozoide durante su trayectoria por unidad de tiempo; la velocidad en línea recta (VSL), distancia que recorre el espermatozoide en línea recta desde el primer al último punto de su trayectoria por unidad de tiempo; y la velocidad de trayectoria promedio (VAP), distancia que recorre el espermatozoide durante la trayectoria media en el tiempo de observación. Además también se obtienen el índice de linealidad que relaciona la VSL y la VCL ($LIN = VSL/VCL$), el índice de rectitud que relaciona la VSL con la VAP ($STR = VSL/VAP$), y el índice de oscilación que relaciona las velocidades VAP y VCL ($WOB = VAP/VCL$) (Bompart et al., 2019a).

La movilidad espermática no sería posible sin ATP, y teniendo en cuenta que la mayor parte de ATP se produce en la mitocondria a través de la vía OXPHOS, se puede decir que las mitocondrias juegan un papel crucial en la motilidad espermática por lo que es de vital importancia analizar la función mitocondrial. Los dos parámetros principales para evaluar la actividad mitocondrial son la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales y el potencial de membrana mitocondrial (MMP).

Parte de la reducción en la motilidad y fertilidad de los espermatozoides asociada con la refrigeración puede deberse al daño oxidativo por la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las mitocondrias son un sitio importante de formación de ROS intracelulares, lo que resulta en una interrupción del transporte de electrones en la fosforilación oxidativa y por lo tanto, una falta de producción de ATP necesario para la motilidad (Guthrie, H. D., 2006). Además, el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa mantiene un potencial de membrana mitocondrial elevado (hMMP), este está asociado con una motilidad normal y una alta capacidad de fertilización, por el contrario, un potencial de membrana mitocondrial bajo se asocia con un nivel elevado de ROS que alteran la estructura de la membrana lo que provoca una reducción en la movilidad y, por tanto, en la tasa de fertilidad (Komsky-Elbaz, A., 2018).

Tanto el potencial de membrana mitocondrial como la producción de ROS mitocondrial se pueden evaluar mediante citometría de flujo tiñendo las muestras de semen.

Para evaluar el MMP se suelen usar sondas fluorescentes MitoTracker®, como por ejemplo MitoTracker Deep Red (MTR) que se acumula selectivamente en la matriz mitocondrial. Se une covalentemente a proteínas mitocondriales al reaccionar con mercaptano libre de residuos de cisteína, lo que permite la tinción del potencial de membrana mitocondrial independientemente del potencial de membrana celular. Así, mitocondrias con hMMP darán una señal fluorescente mayor mitocondrias con potencial de membrana bajo.

La MTR se puede combinar con otras sondas como MitoSOX Red, colorante fluorogénico dirigido específicamente a las mitocondrias de espermatozoides vivos. La oxidación del reactivo MitoSOX con ROS mitocondrial produce fluorescencia.

Otro parámetro espermático importante es el estado del acrosoma, la reacción del acrosoma (AR) implica la fusión de la membrana externa del acrosoma y la membrana plasmática suprayacente, lo que resulta en la liberación de enzimas acrosómicas, esta reacción es esencial para la fusión del espermatozoide con el ovocito. Por lo tanto, la evaluación de la integridad del acrosoma constituye un parámetro útil para evaluar la calidad del semen y la fertilidad. El estado del acrosoma se puede evaluar mediante citometría de flujo con muestras teñidas con carboxifluoresceína (CFDA), los espermatozoides con el acrosoma intacto exhiben una fluorescencia verde brillante en la cabeza, los que tienen el acrosoma dañado o reaccionado no muestran fluorescencia (Komsky-Elbaz, A., 2018).

Por último, la viabilidad, es esencial saber que parte de la muestra corresponde a espermatozoides vivos y que parte corresponde a los muertos, así se obtiene una apreciación real de los parámetros explicados anteriormente. Para evaluar la viabilidad espermática hay varias tinciones que se pueden usar para analizar la muestra en un citómetro de flujo, una de ellas es DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), tinción de ácido nucleico fluorescente azul semipermeable que se asocia con grupos de AT. Las propiedades espectrales del DAPI lo hacen muy adecuado para detectar viabilidad en un citómetro de flujo. Las membranas plasmáticas competentes lo excluyen por lo que las células vivas no presentarían fluorescencia, mientras que las células muertas con la membrana comprometida emitirían fluorescencia, el colorante puede interactuar con el ADN de la célula (Beckman Coulter, Life Sciences).

También se puede usar Yoduro de propidio (PI), marcador impermeable que se une al ADN mediante una intercalación entre las bases con poca o ninguna preferencia de secuencia.

Las células muertas presentaran fluorescencia ya que su membrana estará comprometida y el PI podrá acceder al ADN, mientras que las células vivas no presentarán fluorescencia.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis del estudio es que conociendo que sustratos energéticos son los que mantienen los parámetros de los espermatozoides caprinos conservados a 17°C en medio de PBS se podrá optimizar los diluyentes.

El objetivo del estudio es evaluar el efecto de diferentes sustratos durante la conservación refrigerada a 17°C sobre los siguientes parámetros de calidad espermática en caprino: movilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial, producción de ROS mitocondrial, viabilidad celular y estado del acrosoma.

3. METODOLOGÍA

3.1 Medios y reactivos

En el MasterMix1 (M1) se usó HOECHST 33342 Sigma (B2261-25MG); yoduro de propidio 95-98% SIGMA (PI) (P4170); y carboxifluoresceína diacetato Sigma (C5041) (Yániz, J.L., 2021).

En el MasterMix2 (M2) se usó 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; D9542) a una concentración final de 1 ug/mL; Mitotracker Deep Red (Invitrogen™: M22426) a una concentración de 100 nM; y Mitosox™ Red (Invitrogen™: M36008) a una concentración de 1 µM.

Se utilizó tampón fosfato salino (PBS; D5652)

3.2 Recolección y procesamiento de semen

Se mantuvieron y entrenaron machos cabríos Murciano-Granadina adultos (de 2 a 9 años aproximadamente) en el Centro de Investigación y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA, 39°51'55" N, 0°30'07" W; Segorbe, España).

El CITA-IVIA dispone de un acuerdo con la Directiva 92/65/EEC para la recolección, procesamiento, conservación y almacenamiento de semen (número de registro: ES17RS01OC). El semen se recolectó por medio de una vagina artificial precalentada entre 43 y 46°C desde febrero hasta mayo.

Los eyaculados se colocan en un baño de agua a 25°C. Se lavan con PBS mediante dos centrifugaciones a 500g durante 15 minutos (protocolo de congelación Konyali et al.,2013) para eliminar el plasma seminal. Después de la segunda centrifugación se calcula el volumen y la concentración mediante una cámara Makler (Counting Chamber Makler, Sefi-Medical Instruments).

Se toman 5 alícuotas y se diluyen hasta un total de 250 microlitros con cada uno de los diluyentes PBS según Tabla1 a una concentración final de aproximadamente 560 millones espermatozoides/mL (concentración de las dosis de refrigerado Mocé et al., 2020), y una osmolaridad aproximada de 330mM.

Las muestras se refrigeran a 16°C en un baño de agua programable (velocidad de refrigeración 0,18°C/min): de 20 a 16°C en 20 minutos. Las muestras de semen se transportan al laboratorio (Edificio de Investigación Jerónimo Muñoz, Burjassot, España) mediante una caja de poliespán en un baño de agua a 17°C.

En el laboratorio se guardan en nevera a 17°C durante 3 días, en los que se analizan a 0h, a 24h y a 48h.

Tabla 1. Composición de los diluyentes utilizados con base PBS

	PM		PBS-NACL	PBS-G	PBS-F	PBS-P	PBS-L	
PBS (D8662)			100	100	100	100	100	mL
GLUCOSA (G270)	180,16	35mM		630,56				mg
FRUCTOSA (F3510)	180,16	35mM			630,56			mg
PIRUVATO SÓDICO (P5280)	110,04	35mM				385,14		mg
LACTATO SÓDICO (792G/L)(ML)	112,1	35mM					0,495	mL
NACL (S5886)	58,44	35mM	204,54	102,27*	102,27*			

*Los medios PBS-G y PBS-F se suplementan con 17,5 mM de NaCl para evitar diferencias de osmolaridad con el resto de medios (+70mosm).

3.3 Motilidad (CASA)

La motilidad se evaluó mediante el sistema CASA-Mot (AI Station v1.2; España) con muestras de 3µl de semen cargadas en cámaras de recuento (Spermlide 20 µm; Sperm Analysis Technologies SL, Murcia, España) precalentadas a 37°C.

Se montó una cámara digital (FLYR) de 120 fotogramas por segundo en un microscopio de platina calentada UB203 (UOP/PROISER R+D) usando un objetivo de contraste de fase negativo 10x (AN 0,25).

Se realizaron de tres a cinco capturas por cada muestra para tener un conteo final de 1000 espermatozoides por muestra. Los videos fueron capturados a 100 cuadros/segundos y grabados durante 3 segundos para cada campo.

Los parámetros cinemáticos del esperma evaluados por CASA incluyeron: velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) medida en la reconstitución punto a punto de la trayectoria del esperma; velocidad en línea recta (VSL, $\mu\text{m/s}$), definida por la línea recta entre el primer y último punto de la pista; velocidad de trayectoria promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$).

Además, se calcularon dos proporciones de progresión, expresados como porcentajes: la motilidad total (MT), y la motilidad progresiva (MP).

Las muestras se prepararon siguiendo el protocolo presentado en la Fig2.

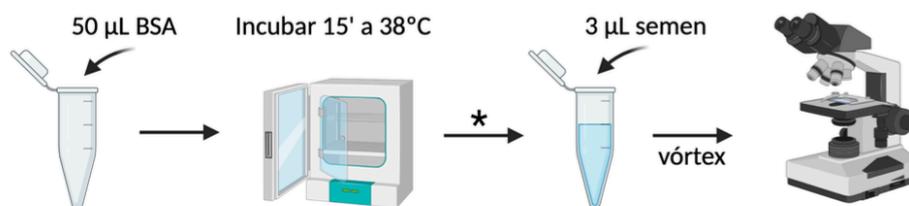


Fig2. Protocolo de motilidad. *Agitar 10 segundos con vórtex la muestra de semen antes de añadir 3µL

3.4 Citometría de flujo

Se usó un citómetro de flujo BD LSRFortessa con cuatro láseres de excitación (UV 355 nm, azul 488 nm, amarillo verdoso 561 nm y rojo 640 nm) para evaluar el estado mitocondrial, la respuesta a la oxidación y la viabilidad.

Estos análisis fueron realizados por la sección de cultivo celular y citometría de flujo del Servicio Central de Investigaciones Experimentales (SCSIE) de la Universitat de València. Se analizaron dos muestras por macho y diluyente, una teñida con M1 (HOECHST, Yoduro de propidio, carboxifluoresceína) en la que se evaluó la viabilidad y el estado del acrosoma; y otra teñida con M2 (DAPI, MitoTracker Deep Red, MitoSOX) en la que se evaluó la viabilidad, la presencia de ROS mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial.

Las muestras se prepararon según la tinción siguiendo los protocolos presentados en la Fig3 para la tinción M1, y Fig4 para la tinción M2.

Los datos se obtuvieron mediante el software BD FACSDiva 8.0.2. que permite la subdivisión de las poblaciones de las diferentes tinciones.

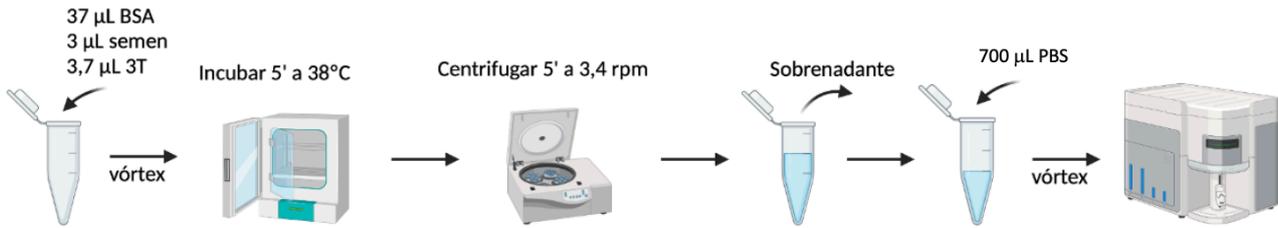


Fig3. Protocolo de citometría para tinción M1

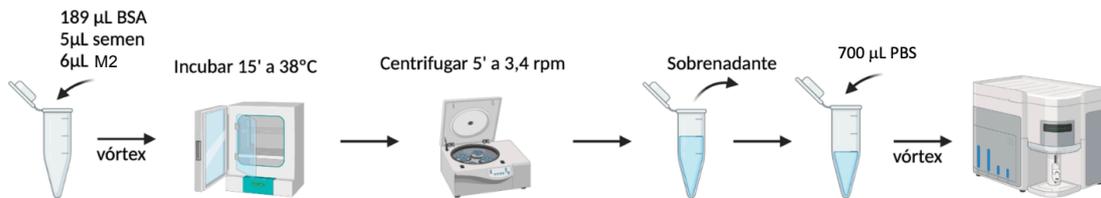


Fig4. Protocolo de citometría para tinción M2

3.4.1 Viabilidad

Para evaluar la viabilidad espermática se utilizó el colorante DAPI (componente de tinción M2). Según la intensidad de fluorescencia se diferencian tres poblaciones espermáticas: espermatozoides vivos, muertos, y moribundos (Fig 5).

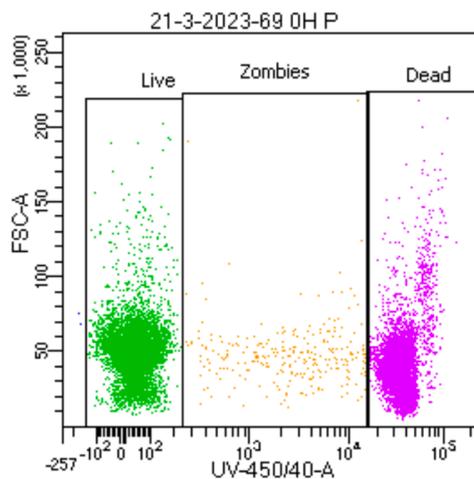


Fig 5. Análisis de viabilidad espermática a 0h en medio P obtenido mediante citometría de flujo, muestra teñida con DAPI (tinción M2). En verde (DAPI -) la población de espermatozoides vivos, en amarillo la población de espermatozoides moribundos (DAPI +), y en rosa la población de espermatozoides muertos (DAPI +).

3.4.2 Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides se midió con MitoTracker Deep Red (componente de tinción M2). Los resultados se expresaron en dos grupos: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial bajo (despolarizado) o alto (hMMP; polarizado) (Fig 6).

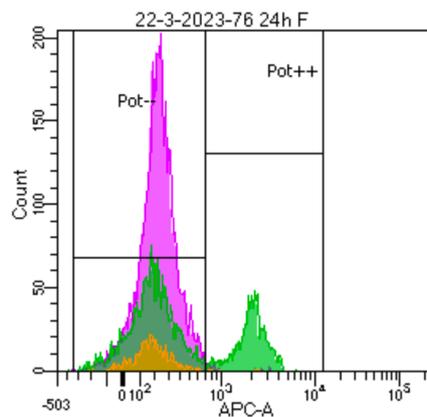


Fig 6. Análisis del potencial de membrana mitocondrial a 24h y medio F obtenido mediante citometría de flujo, muestra teñida con MitoTracker Deep Red (tinción M2). La población coloreada en verde corresponde a espermatozoides vivos, con hMMP (alto potencial de membrana mitocondrial, MTR +) o con bajo potencial de membrana mitocondrial (MTR -), la población coloreada en amarillo corresponde a espermatozoides moribundos, todos muestran bajo potencial de membrana, y la población rosa corresponde a espermatozoides muertos con bajo potencial de membrana mitocondrial (MTR -).

3.4.3 Presencia de ROS mitocondrial

El nivel de estrés oxidativo se midió con MitoSox Red (componente de tinción M2). Los resultados se expresaron en dos poblaciones: elevado estrés oxidativo y bajo o nulo estrés oxidativo (Fig 7).

En la Fig 8 se muestra el análisis general de la tinción M2, la representación conjunta de la viabilidad, el potencial de membrana mitocondrial y la presencia de ROS mitocondrial.

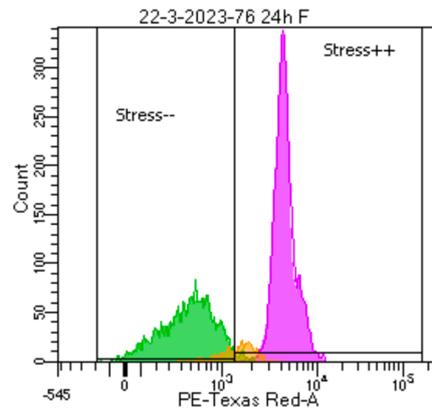


Fig 7. Análisis del estrés oxidativo mitocondrial a 24h en medio F obtenido mediante citometría de flujo, muestra teñida con MitoSox Red (tinción M2). La población coloreada en verde corresponde a espermatozoides vivos no estresados (bajo estrés oxidativo), la población rosa corresponde a espermatozoides muertos con elevado nivel de estrés oxidativo, y en amarillo se muestran los espermatozoides moribundos, algunos con bajo nivel de estrés oxidativo (Stres--), y otros con elevado nivel de estrés oxidativo (Stres++).

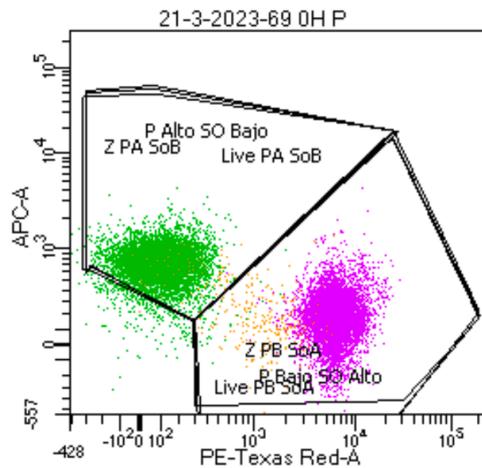


Fig 8. Análisis general de la muestra teñida con MasterMix2 (M2), la población en el recuadro superior izquierdo corresponde a espermatozoides vivos (población coloreada en verde), con alto potencial de membrana mitocondrial y baja presencia de ROS mitocondrial (espermatozoides sanos), la población en el recuadro inferior derecho corresponde a espermatozoides muertos (población coloreada en rosa) o espermatozoides moribundos (población coloreada en amarillo), con bajo potencial de membrana mitocondrial y elevada presencia de ROS mitocondrial.

3.5 Análisis estadístico

Se han realizado tres réplicas de todos los grupos experimentales. Antes de realizar el análisis estadístico se comprobó la normalidad con la prueba Kolmogorov-Smirnov. Aquellas variables que no tenían una distribución normal se transformaron antes de su análisis, se realizó una transformación logarítmica para las variables dependientes no porcentuales (VCL, VSL, VAP), y el arcoseno de la raíz cuadrada para las variables dependientes porcentuales.

Se utilizó el análisis de modelo lineal generalizado (IBM SPSS Statistics, v26) incluyendo los efectos principales, el tiempo y el sustrato, y todas las posibles interacciones dobles en el modelo para todas las variables.

Los resultados de los efectos principales se muestran como media \pm error estándar. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de la conservación seminal a diferentes tiempos y sustratos sobre la motilidad y cinética de los espermatozoides

Los niveles significativos y los resultados de los efectos principales del modelo se presentan en las Tablas 2 y 3. El tiempo no presenta diferencias significativas en las variables VCL y VAP, y el factor tiempo por sustrato tampoco presenta ninguna diferencia significativa en la variable VSL. La motilidad total (TM), la motilidad progresiva (PM) y la velocidad de trayectoria promedio (VAP) del esperma disminuyeron significativamente con el tiempo, mientras que las velocidades VCL y VAP tuvieron un pequeño aumento.

En relación con el sustrato, los espermatozoides diluidos en medios de lactato y piruvato revelaron mayor TM y PM, mientras que las velocidades VCL, VAP y VSL fueron mayores en los espermatozoides diluidos en medios de glucosa y fructosa (Tabla 3).

Tabla 2. Niveles significativos de los factores para las variables estudiadas.

Factores	Variables ¹				
	MT	PM	VCL	VAP	VSL
Tiempo	**	**	NS	NS	**
Sustrato	**	**	**	**	**
Tiempo*Sustrato	**	**	**	**	NS

¹MT: porcentaje de espermatozoides móviles; PM: porcentaje de motilidad progresiva; VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VAP: velocidad de trayectoria promedio ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m/s}$). NS: no hay diferencias significativas; ** $p < 0,001$

Tabla 3. Efecto de la conservación seminal a diferentes tiempos y sustratos sobre la motilidad y cinética de los espermatozoides.

Factores ¹	Variables ²				
	MT	PM	VCL	VAP	VSL
TIEMPO (h)					
0	62 \pm 2,4 ^a	97,2 \pm 0,3 ^a	151 \pm 3,6 ^a	87,9 \pm 3,2 ^a	69,8 \pm 3,3 ^a
24	26,8 \pm 3,5 ^b	86,8 \pm 2,1 ^b	148,6 \pm 4,6 ^a	79,1 \pm 3,0 ^b	45,1 \pm 2,3 ^a
48	15,6 \pm 2,8 ^b	71,1 \pm 4,3 ^c	166,5 \pm 11,1 ^a	94,3 \pm 8,9 ^c	31,8 \pm 1,8 ^b
SUSTRATO (μL)					
G	28,4 \pm 6,3 ^b	78,7 \pm 5,7 ^c	178,6 \pm 11,4 ^a	105 \pm 9,5 ^a	52,1 \pm 5,1 ^a
F	28,2 \pm 5,5 ^b	85,3 \pm 3,9 ^b	163,3 \pm 5,0 ^a	94,1 \pm 4,3 ^a	56,1 \pm 4,7 ^a
L	47,7 \pm 3,7 ^a	93 \pm 1,0 ^a	138,5 \pm 4,8 ^b	71,5 \pm 5,0 ^b	49,9 \pm 5,4 ^a
P	45,9 \pm 4,8 ^a	92,5 \pm 2,4 ^a	132,7 \pm 6,0 ^b	72,1 \pm 4,2 ^b	50,3 \pm 4,6 ^a
NaCl	23,8 \pm 7,2 ^c	75,2 \pm 5,7 ^c	164,6 \pm 13,1 ^a	93,4 \pm 9,6 ^a	35,8 \pm 4,3 ^b

¹G: glucosa; F: fructosa; L: lactato; P: piruvato; NaCl: cloruro de sodio

²MT: porcentaje de motilidad total; PM: porcentaje de motilidad progresiva; VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VAP: velocidad de trayectoria promedio ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m/s}$)

4.2 Efecto de la conservación seminal a diferentes tiempos y sustratos sobre el potencial de membrana mitocondrial, viabilidad y respuesta oxidativa

Todos los niveles de los factores para las variables estudiadas son significativos, los resultados de los efectos principales del modelo se presentan en la Tabla 4. La tasa de espermatozoides vivos decrece relativamente mientras que se ve un gran aumento en cuanto a espermatozoides vivos pero no funcionales.

Hubo una caída significativa en la tasa de hMMP de los espermatozoides a medida que aumentó el tiempo, principalmente durante las primeras 24 h (56,1, 32,7 y 29,2 % de MMP alta durante 0, 24 y 48 h, respectivamente; $p < 0,05$; Tabla 5). Se observaron resultados similares en cuanto a los espermatozoides sanos. La producción de Ros mitocondrial aumenta con el tiempo. En relación con el sustrato hay una clara diferencia entre los sustratos G y F con elevada tasa de estrés oxidativo, y baja tasa de espermatozoides sanos y con alto potencial de membrana; y los sustratos L y P con espermatozoides sanos, con bajo estrés oxidativo y alto potencial de membrana mitocondrial.

Tabla 4. Efecto de la conservación seminal a diferentes tiempos y sustratos sobre la viabilidad y función mitocondrial de los espermatozoides.

Factores ¹	Variables ²			
	Vivos	hMMP	ROS	Sanos
TIEMPO (h)				
0	55,4 ± 2,2 ^a	56,1 ± 2,3 ^a	40,7 ± 2,7 ^c	56,6 ± 2,4 ^a
24	50,1 ± 2,5 ^b	32,7 ± 3,9 ^b	56,8 ± 2,9 ^b	31,6 ± 3,9 ^b
48	40,9 ± 3,6 ^c	29,2 ± 4,5 ^c	68,8 ± 4,6 ^a	26,3 ± 4,5 ^c
SUSTRATO (uL)				
G	36,7 ± 4,2 ^c	27 ± 5,4 ^b	66,3 ± 5,0 ^a	25,5 ± 5,6 ^b
F	37 ± 3,7 ^c	27,3 ± 4,7 ^b	65,8 ± 4,7 ^a	25,9 ± 5,0 ^b
L	54,8 ± 2,7 ^b	56,4 ± 2,8 ^a	40,5 ± 3,3 ^b	55,5 ± 2,9 ^a
P	53,6 ± 2,5 ^b	55,3 ± 2,7 ^a	42,9 ± 2,9 ^b	54,4 ± 2,8 ^a
NaCl	61,8 ± 1,9 ^a	30,6 ± 6,1 ^b	61,6 ± 6,1 ^a	29,4 ± 6,4 ^b

¹G: glucosa; F: fructosa; L: lactato; P: piruvato; NaCl: cloruro de sodio

²Vivos: porcentaje de espermatozoides vivos; hMMP: porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial; ROS: porcentaje de espermatozoides con presencia de ROS mitocondrial; Sanos: porcentaje de espermatozoides sanos

4.3 Efecto del tiempo en los diferentes parámetros de motilidad espermática según el sustrato

La motilidad espermática total (MT) muestra una disminución en los medios de F, G, L a las 24 y 48 horas, mientras que los medios L y P mantienen una motilidad total bastante superior desde las 0h hasta las 48h (Fig 9).

Después de las 24h, la motilidad espermática progresiva (PM) disminuye significativamente en todos los medios, excepto en el medio L en el que mantuvo el mismo nivel que PM a 0 h. En este caso L y P también son superiores al resto de sustratos (Fig 10).

Respecto la velocidad curvilínea (VCL), el grupo control N muestra un gran aumento desde las 0h hasta las 48h, G y F muestran un pequeño aumento a las 24h, L y P se quedan por debajo del resto de sustratos (Fig 11). De forma similar sucede en la velocidad de trayectoria promedio (VAP) (Fig 12).

La velocidad en línea recta (VSL) disminuye significativamente entre las 0 y 24h y continua disminuyendo de manera más relativa a partir de las 24h hasta las 48h en todos los medios, el grupo control N es bastante inferior al resto (Fig 13).

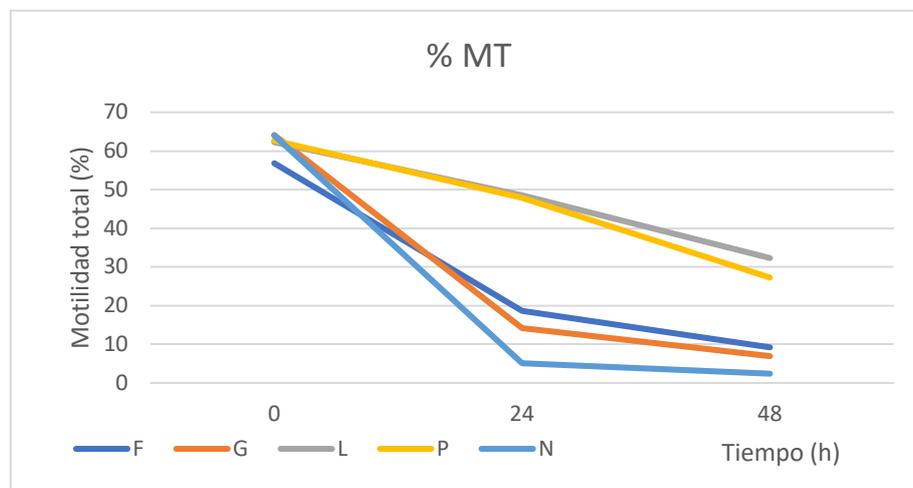


Fig 9. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre la motilidad espermática total (MT) de espermatozoides caprinos.

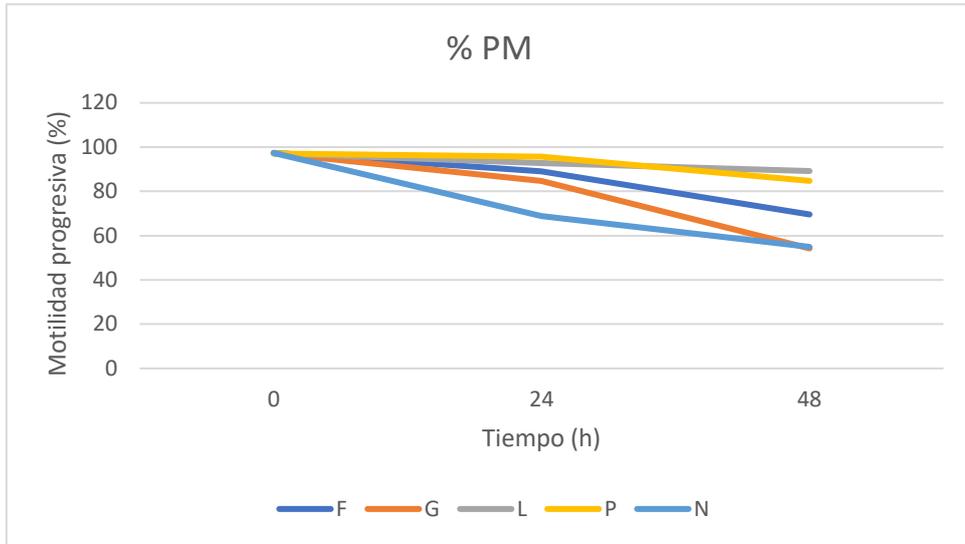


Fig 10. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre la motilidad espermática progresiva (PM) de espermatozoides caprinos.

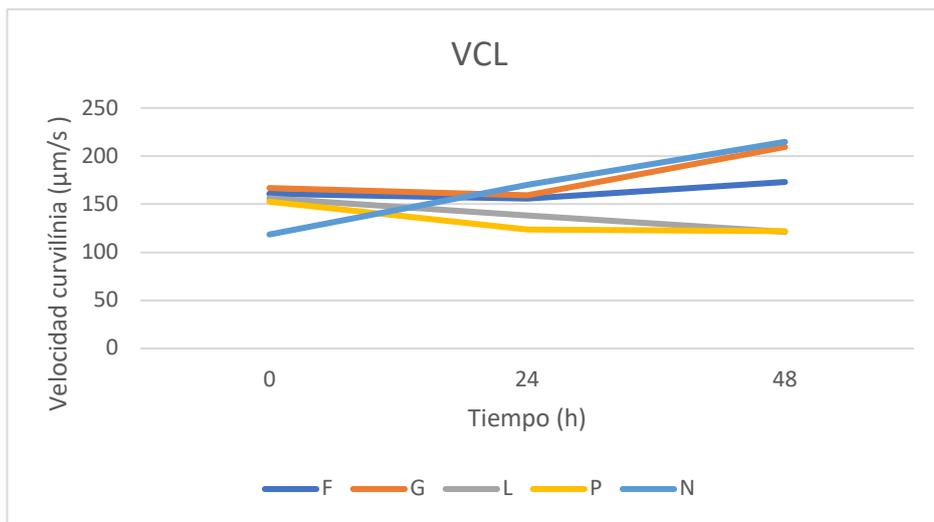


Fig 11. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre la velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides caprinos.

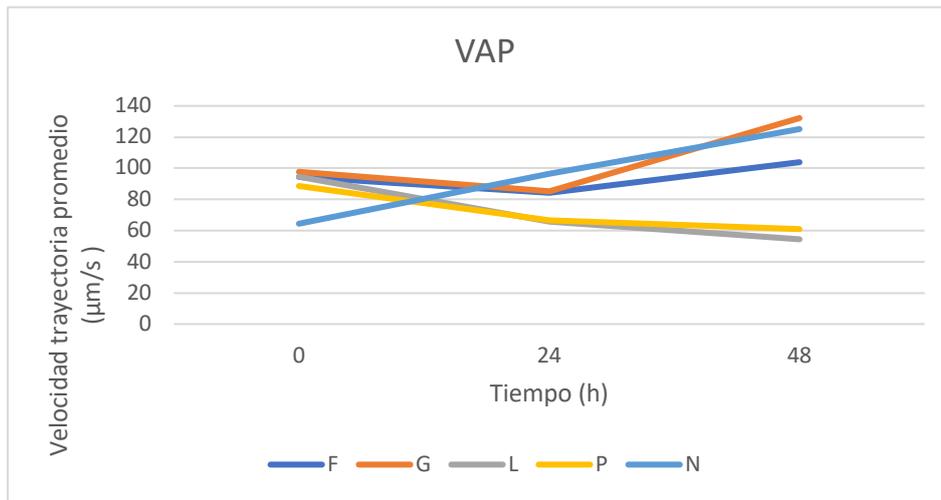


Fig 12. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre la velocidad de trayectoria promedio (VAP) de espermatozoides caprinos.

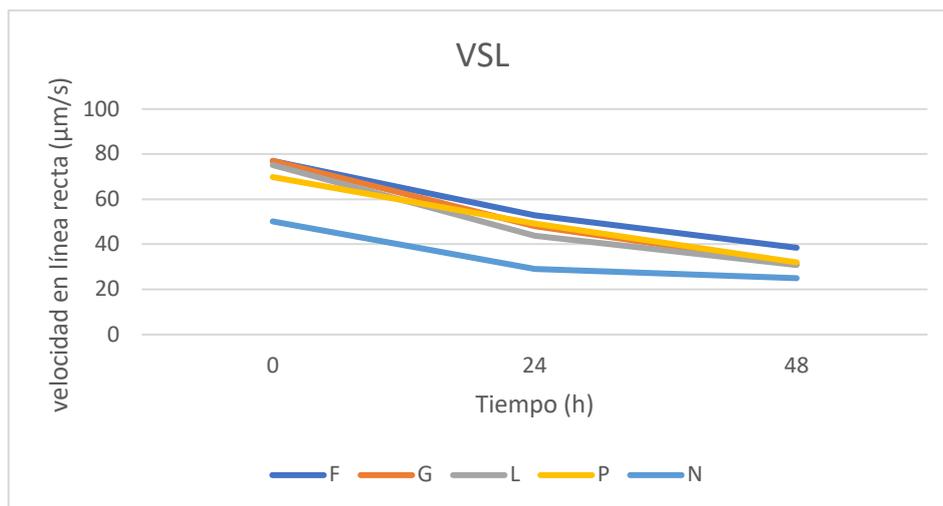


Fig 13. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre la velocidad en línea recta (VSL) de espermatozoides caprinos.

4.4 Efecto del tiempo en los diferentes parámetros de función mitocondrial y viabilidad según el sustrato

En cuanto al potencial de membrana mitocondrial existe una gran diferencia entre los grupos F, G y N y los grupos L y P, siendo estos últimos superiores. F, G y N disminuyen significativamente de las 0h a las 48h mientras que L y P no solo no disminuyen si no que llegan a aumentar (Fig 14). En la oxidación mitocondrial ocurre lo contrario, los grupos F, G y N muestran un crecimiento constante desde las 0h hasta las 48h mientras que L y P son constantes o disminuyen mínimamente (Fig 15).

Los grupos P, L y N presentan bastante más viabilidad que los grupos F y G (Fig 16) pero solo los grupos P y L presentan una salud constante durante todo el periodo temporal, F, G y N muestran un gran deterioro desde las 0h hasta las 48h (Fig 17).

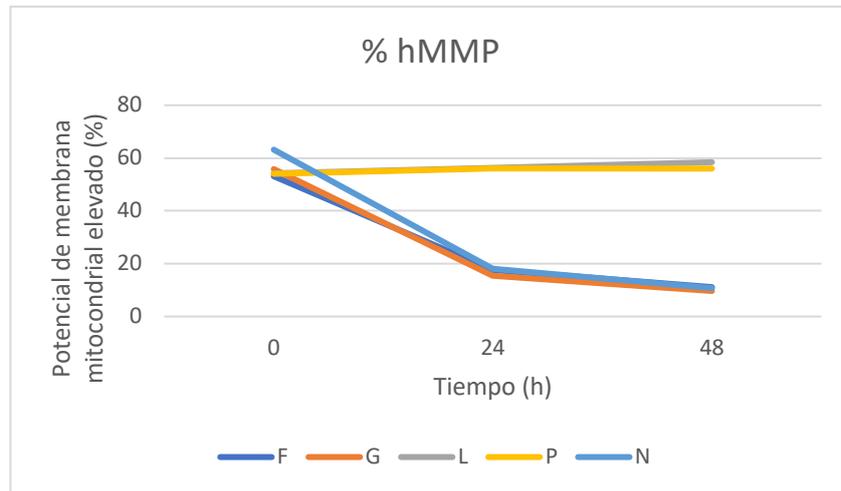


Fig 14. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre el potencial de membrana mitocondrial (hMMP) de espermatozoides caprinos.

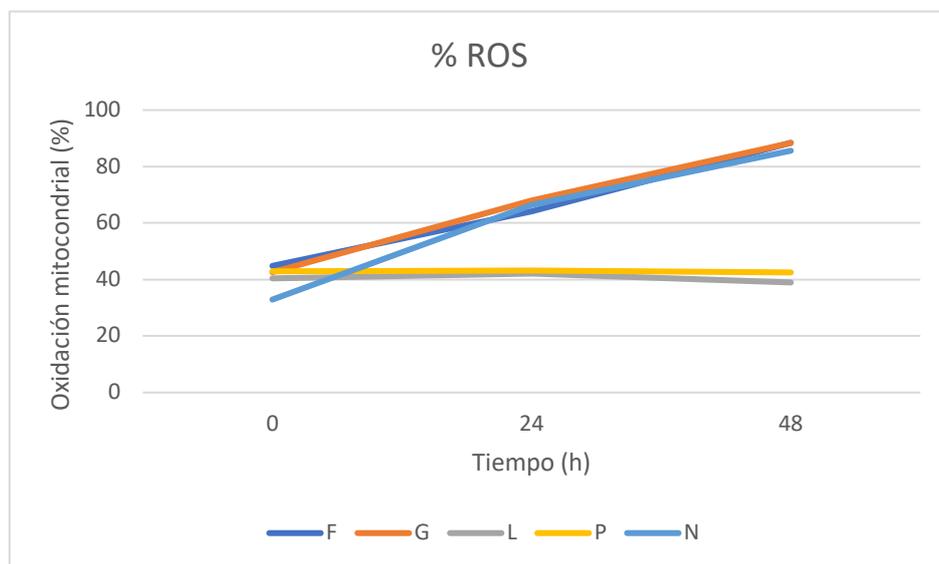


Fig 15. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre la oxidación mitocondrial de espermatozoides caprinos.

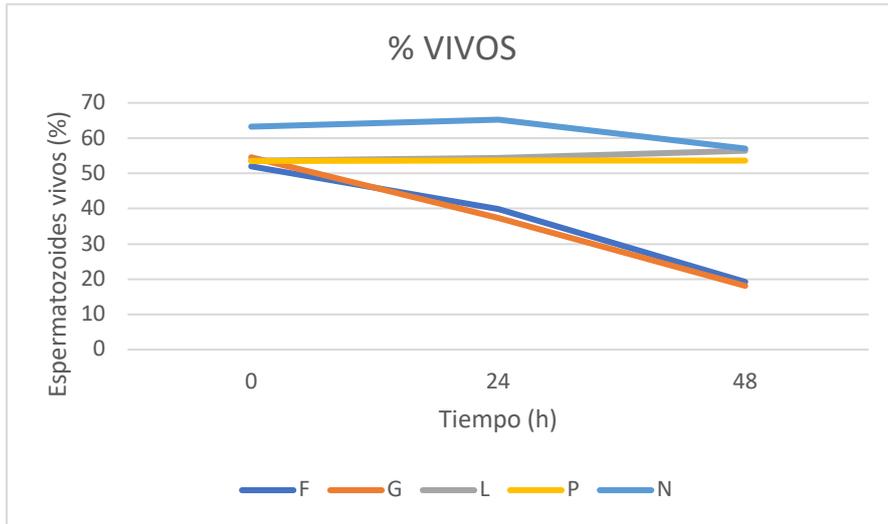


Fig 16. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre la viabilidad de espermatozoides caprinos.

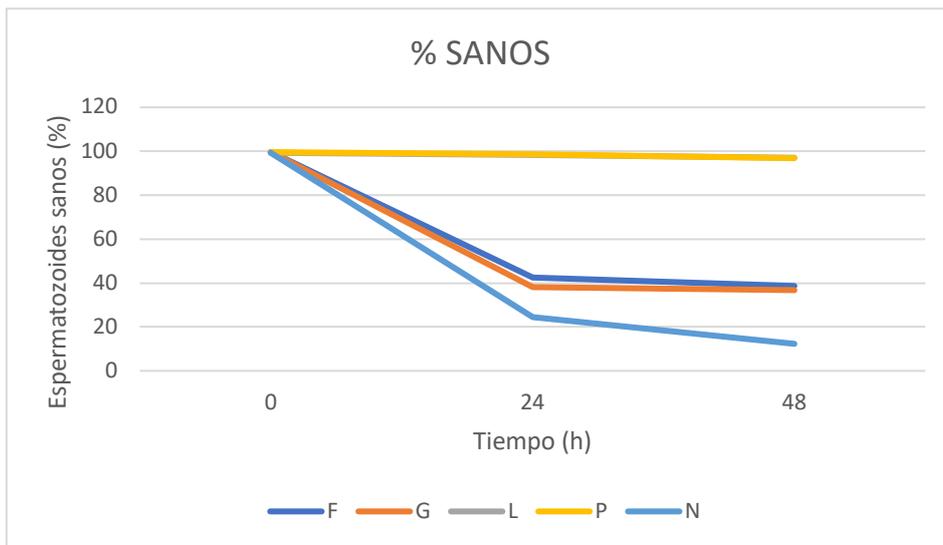


Fig 17. Efecto del tiempo (0h-24h-48h) y diferentes sustratos (F, G, L, P, N) sobre la salud de espermatozoides caprinos.

5. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue examinar el efecto de los diferentes sustratos durante el almacenamiento líquido del semen de cabra sobre la motilidad, la viabilidad y la actividad mitocondrial. Como se señaló anteriormente, la principal objeción a la refrigeración es la corta vida útil de los espermatozoides.

En semen caprino, como se encontró en otros trabajos, se observa que la motilidad de los espermatozoides disminuyó a medida que aumentaba el tiempo, además, se observa que otros parámetros de calidad de los espermatozoides de cabra almacenados a 17°C, como las velocidades y el hMMP, también disminuyeron a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento (Sadeghi, S., 2020).

La elevada presencia de ROS mitocondrial se ha utilizado como parámetro de calidad del esperma ya que se correlacionó negativamente con la fertilidad y se observa que las especies reactivas de oxígeno aumentaban a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento, suponiendo que los espermatozoides almacenados durante 48 h tendrían un potencial de fertilidad más bajo.

En este estudio, se prueban cuatro sustratos, glucosa, fructosa, lactato, y piruvatos utilizados comúnmente en la refrigeración de semen caprino.

Respecto a la motilidad, se observa que tanto para la motilidad total como para la progresiva los mejores sustratos son el lactato y el piruvato, teniendo en cuenta que para la motilidad se necesita energía se puede decir que los espermatozoides caprinos han usado la vía OXPHOS para la obtención de energía. Sin embargo, las velocidades más elevadas se observan con los sustratos de glucosa y fructosa, lo que puede significar que el aporte de energía de la vía glucolítica junto con la vía OXPHOS aportan más velocidad espermática.

Al observar las interacciones de motilidad y velocidad con el tiempo se ve que la motilidad total y la progresiva en los sustratos lactato y piruvato descienden progresivamente con el tiempo mientras que el resto de los sustratos no, por ejemplo tanto glucosa como fructosa y el grupo control presentan un pico de descenso a las 24h en la motilidad total, mientras que en la motilidad progresiva presentan un pico álgido a las 24h. Esto podría deberse a que la vía glucolítica deja de funcionar pasado cierto tiempo, mientras que la vía OXPHOS funciona de manera progresiva durante las 48h.

Respecto a las interacciones entre el tiempo y las velocidades, los grupos con velocidades más elevadas son la glucosa y el grupo control excepto en la velocidad en línea recta donde el grupo más elevado es la fructosa.

Las muestras con lactato y piruvato como diluyentes obtienen mayor viabilidad que los sustratos fructosa y glucosa, aunque por debajo del grupo control, pero al observar espermatozoides sanos, el grupo control decae incluso por debajo de los sustratos glucosa y fructosa, por lo que se puede decir que el piruvato y el lactato ofrecen mayor viabilidad. Las interacciones de la viabilidad con el tiempo muestran que los grupos lactato y piruvato se mantienen estables de las 0h hasta las 48h, mientras que fructosa y glucosa decae sobre todo a partir de las 24h.

Se observa, por tanto, que la fosforilación oxidativa aporta el ATP necesario para realizar las funciones celulares y mantenerse no solo con vida, sino con salud, mientras que la vía glucolítica no aporta la cantidad de energía necesaria para mantener el espermatozoide con vida, y sobre todo, no aporta la energía necesaria pasadas 24h.

Hay mayor presencia de ROS mitocondrial en espermatozoides de los grupos glucosa y fructosa con respecto a los grupos de lactato y piruvato, en consecuencia, los espermatozoides de los grupos lactato y piruvato tienen el potencial de membrana más elevado que los grupos de glucosa y fructosa.

Al observar las interacciones con el tiempo se observa una gran diferencia entre los grupos lactato y piruvato, que mantienen un elevado potencial de membrana mitocondrial y el resto de los grupos, que presentan potencial de membrana mitocondrial bajo sobre todo a partir de las 24h. En la interacción entre el tiempo y la producción de ROS mitocondrial se observa una constante en los grupos de lactato y piruvato, es decir, la vía OXPHOS prácticamente no produce especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias, mientras que la vía glucolítica genera una gran cantidad de ROS mitocondrial, lo que a su vez afecta al potencial de membrana mitocondrial.

Los resultados obtenidos concuerdan con la hipótesis propuesta.

6.CONCLUSIÓN

Según los resultados se concluye que el esperma caprino almacenado a 17°C en PBS mantiene mejores parámetros de calidad cuando se utiliza lactato y piruvato como sustratos energéticos. En estudios futuros se evaluará el efecto de los sustratos lactato y piruvato a diferentes concentraciones y con bloqueadores de las diferentes rutas metabólicas sobre los parámetros de calidad espermáticos con el objetivo de desarrollar un medio de conservación óptimo para la refrigeración de semen caprino.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amiridis, G. S., & Cseh, S. (2012). Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal reproduction science*, 130(3-4), 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.009>
2. Bompart, D., Vázquez, R. F., Gómez, R., Valverde, A., Roldán, E. R. S., García-Molina, A., & Soler, C. (2019a). Combined effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics. *Animal Reproduction Science*, 209, 106169. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.106169>
3. Darr, C. R., Varner, D. D., Teague, S., Cortopassi, G. A., Datta, S., & Meyers, S. A. (2016). Lactate and pyruvate are are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS production. *Biology of reproduction*, 95(2), 34. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140707>
4. de Figueiredo, J. R., Cadenas, J., de Lima, L. F., & Santos, R. R. (2020). Advances in in vitro folliculogenesis in domestic ruminants. *Animal reproduction*, 16(1), 52–65. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-123>
5. Del Gallego, R., Sadeghi, S., Blasco, E., Soler, C., Yániz, J. L., & Silvestre, M. A. (2017). Effect of chamber characteristics, loading and analysis time on motility and kinetic variables analysed with the CASA-mot system in goat sperm. *Animal reproduction science*, 177, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.010>

6. Ferramosca, A., & Zara, V. (2014). Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *BioMed research international*, 2014, 902953. <https://doi.org/10.1155/2014/902953>
7. Gibb, Z., Lambourne, S. R., Quadrelli, J., Smith, N. D., & Aitken, R. J. (2015). L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biology of reproduction*, 93(4), 104. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131326>
8. Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of animal science*, 84(8), 2089–2100. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-766>
9. Hernández-Avilés, C., Ramírez-Agámez, L., Love, C. C., Friedrich, M., Pearson, M., Kelley, D. E., Beckham, A. M. N., Teague, S. R., LaCaze, K. A., Brinsko, S. P., & Varner, D. D. (2021). The effects of metabolic substrates glucose, pyruvate, and lactate added to a skim milk-based semen extender for cooled storage of stallion sperm. *Theriogenology*, 161, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.017>
10. Komsky-Elbaz, A., & Roth, Z. (2018). Fluorimetric techniques for the assessment of sperm membranes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (141), 10.3791/58622. <https://doi.org/10.3791/58622>
11. Sadeghi, S., Del Gallego, R., García-Colomer, B., Gómez, E. A., Yániz, J. L., Gosálvez, J., López-Fernández, C., & Silvestre, M. A. (2020). Effect of sperm concentration and storage temperature on goat spermatozoa during liquid storage. *Biology*, 9(9), 300. <https://doi.org/10.3390/biology9090300>
12. Salvador, I., Yániz, J., Viudes-de-Castro, M. P., Gómez, E. A., & Silvestre, M. A. (2006). Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 degrees C. *Theriogenology*, 66(4), 974–981. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.042>

13. Yániz, J. L., Palacín, I., Silvestre, M. A., Hidalgo, C. O., Tamargo, C., & Santolaria, P. (2021). Ability of the ISAS3Fun Method to Detect Sperm Acrosome Integrity and Its Potential to Discriminate between High and Low Field Fertility Bulls. *Biology*, 10(11), 1135. <https://doi.org/10.3390/biology10111135>

AUTOEVALUACIÓN

Mi paso por BIOTSPERM ha sido no solo enriquecedor a nivel de aprendizaje sino también a nivel personal, por un lado he aprendido sobre el trabajo de investigación, desde realizar el proceso experimental hasta analizar los resultados del trabajo realizado en el laboratorio; y por otro lado he aprendido el trabajo que una investigación conlleva, a dar una explicación científica ante unos resultados inesperados, o a hacer las modificaciones necesarias cuando ha surgido algún error al trasladar el proceso experimental al laboratorio.

Todas mis expectativas se han cumplido, antes de llegar al grupo de investigación esperaba un buen ambiente de trabajo y compañerismo, he tenido la suerte de compartir laboratorio con una compañera de biotecnología de la Universidad de Valencia y una doctorada que me ha explicado todo lo que necesitaba saber y me ha ayudado en todo el proceso.

En cuanto a conceptos aprendidos, principalmente el funcionamiento espermático, sus parámetros de calidad y su bioenergética, además he conocido las diferentes técnicas de inseminación artificial actuales. También he aprendido a utilizar el sistema informático CASA y a ver los espermatozoides en el microscopio.

He trabajado con un citómetro de flujo, y por lo tanto, he aprendido a cómo preparar las muestras antes de analizarlas en el citómetro y, sobre todo, ha analizar los resultados.

Como conclusión, mi paso por el grupo de investigación BIOTSPERM ha sido de gran ayuda para mi desarrollo laboral y personal enfocado a la investigación, y me ha ofrecido experiencia laboral en el sector de la biotecnología.