

R-221 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 269-270, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc116>

A first study on sperm sexing in water buffalo through magnetic nanoparticles

Syed Murtaza Hassan Andrabi*,
Muhammad Hammad Fayyaz, Muhammad Shafiq Haider,
Ghulam Muhammad Ali

Animal Reproduction and Genetics Program, Animal Sciences Institute, National Agricultural Research Centre, PARC, Islamabad 44000, Pakistan

*Corresponding author: Andrabi, Syed Murtaza Hassan
(andrabi123@yahoo.com)

ABSTRACT

Gender pre-selection is a genetic tool of economic significance, as it permits animal breeders to produce sex-specific progeny, thereby increasing profitability and genetic gain in the livestock industry. A higher percentage of female calves is preferable for dairy production. In Pakistan, water buffalos are primarily kept for dairy purposes. Therefore, this study was designed to optimize the magnetic nanoparticles (MNPs) based sperm sexing technique in water buffalo. Qualified semen samples from five buffalo bulls were pooled and divided into four aliquots. Each aliquot of 50 million sperm was diluted in 1 mL of modified human tubal fluid (mHTF). Three ali-

Un primer estudio sobre sexado de espermatozoides en búfalos de agua mediante nanopartículas magnéticas

Syed Murtaza Hassan Andrabi*,
Muhammad Hammad Fayyaz, Muhammad Shafiq Haider,
Ghulam Muhammad Ali

Programa de Genética y Reproducción Animal, Instituto de Ciencias Animales, Centro Nacional de Investigación Agrícola, PARC, Islamabad 44000, Pakistán

*Autor de correspondencia: Andrabi, Syed Murtaza Hassan
(andrabi123@yahoo.com)

RESUMEN

La preselección de sexo en ganadería es una herramienta genética de importancia económica, ya que permite a los criadores de animales producir progenie de sexo específico, aumentando así la rentabilidad y la ganancia genética en la industria ganadera. Es preferible un mayor porcentaje de terneras para la producción lechera. En Pakistán, los búfalos de agua se crían principalmente con fines lácteos. Por lo tanto, este estudio fue diseñado para optimizar la técnica de sexado de semen basada en nanopartículas magnéticas (MNP) en búfalos de agua. Se reunieron muestras de semen calificadas de

quots (sexed groups) were incubated with 0.67 ml of negatively charged MNPs suspension. The fourth aliquot was incubated without MNPs (called "control group"). Each tube containing sperm-MNPs suspension was slowly shaken for 5 minutes for uniform mixing. The MNPs were negatively charged and (provided by Clemente Associates Inc, Prescott, Arizona, USA) had a diameter of 50 nanometers. The interaction between the negative charge of MNPs and the Z electrical potential of spermatozoa was different for those spermatozoa carrying an X chromosome (-20 mV) and those carrying a Y chromosome (-16 mV). Therefore, the Y chromosome-bearing spermatozoa remained closer to MNPs. Three sexed groups were exposed to a magnet for 10, 20, and 30 minutes. The control group was exposed to the magnet for 20 minutes. Consequently, in the sexed groups, the Y-bearing sperm-MNP complexes remained attached to the tube's inner wall due to the magnetic force. In contrast, the X-chromosome spermatozoa remained suspended in the medium. Then, suspended spermatozoa carrying the X chromosome were slowly aspirated. The control group was also aspirated and transferred to a new tube. After aspiration, each group's progressive motility (PM, %) of spermatozoa was assessed through a computer-assisted sperm analyzer (CASA). After that, spermatozoa were centrifuged at $226 \times g$ for 5 minutes to remove the mHTF, and DNA was extracted. Validation of the sexing technique was done through SYBR® Green Real-Time (RT) PCR using two sets of primers for gender-specific genes, i.e., X-linked proteolipid protein (PLP) and sex-determining region Y protein (SRY). Results revealed that PM was similar ($p > 0.05$) in all groups (ranging from 62 to 65%). The mean fold expression of the PLP gene (X chromosome bearing sperm) was higher ($p < 0.05$) in all sexed groups (average: 15.34-fold = 91.09% X chromosome bearing sperm) as compared to control (1.60-fold). In conclusion, the MNPs-based technique appeared to be an effective method for water buffalo sperm sexing as validated by RT PCR.

Keywords: buffalo sperm, sperm sexing, magnetic nanoparticles, Real-Time PCR.

cinco búfalos reproductores y se dividieron en cuatro alícuotas. Cada alícuota de 50 millones de espermatozoides se diluyó en 1 ml de líquido tubárico humano modificado (mHTF). Se incubaron tres alícuotas (grupos sexados) con 0,67 ml de suspensión de MNP cargada negativamente. La cuarta alícuota se incubó sin MNP (llamada "grupo de control"). Cada tubo que contenía suspensión de espermatozoa-MNP se agitó lentamente durante 5 minutos para una mezcla uniforme. Los MNP estaban cargados negativamente y (proporcionados por Clemente Associates Inc, Prescott, Arizona, EE. UU.) y tenían un diámetro de 50 nanómetros. La interacción entre la carga negativa de las MNP y el potencial eléctrico Z de los espermatozoides fue diferente para aquellos espermatozoides que portan un cromosoma X (-20 mV) y aquellos que portan un cromosoma Y (-16 mV). Por lo tanto, los espermatozoides portadores del cromosoma Y permanecieron más cerca de las MNP. Se expusieron tres grupos sexados a un imán durante 10, 20 y 30 minutos. El grupo de control estuvo expuesto al imán durante 20 minutos. En consecuencia, en los grupos sexados, los complejos espermatozoide-MNP con carga cromosómica Y permanecieron adheridos a la pared interna del tubo debido a la fuerza magnética. Por el contrario, los espermatozoides del cromosoma X permanecieron suspendidos en el medio. Luego, se aspiraron lentamente los espermatozoides suspendidos que portaban el cromosoma X. El grupo de control también fue aspirado y transferido a un tubo nuevo. Después de la aspiración, se evaluó la motilidad progresiva (PM, %) de los espermatozoides de cada grupo mediante un analizador de esperma asistido por computadora (CASA). Después de eso, los espermatozoides se centrifugaron a $226 \times g$ durante 5 minutos para eliminar el mHTF y se extrajo el ADN. La validación de la técnica de sexado se realizó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) SYBR® Green utilizando dos conjuntos de cebadores para genes específicos de género, es decir, proteína proteolípida ligada al cromosoma X (PLP) y proteína de la región Y determinante del sexo (SRY). Los resultados revelaron que la MP fue similar ($p > 0,05$) en todos los grupos (entre 62 y 65%). La expresión media del gen PLP (esperma con cromosoma X) fue mayor ($p < 0,05$) en todos los grupos sexados (promedio: 15,34 veces = 91,09% de esperma con cromosoma X) en comparación con el control (1,60 veces). En conclusión, la técnica basada en MNP mostró ser un método eficaz para el sexado de semen de búfalo de agua, validado por RT PCR.

Palabras clave: semen de búfalo, sexado de espermatozoides, nanopartículas magnéticas, RT PCR.