

100 Ejempl.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SEPARACION DE ESPERMATOZOIDES "X" E "Y"
EN SEMEN DE CONEJO A TRAVES DE SU
FILTRACION EN COLUMNAS DE SEPHADEX.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :
FRANCISCO JAVIER HERNANDEZ

ASESORES: M.V.Z. ARTURO DUCHTAEU
M.V.Z. JAVIER VALENCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Pág.
I. Resumen.	i
II. Introducción.....	1
III. Material y Métodos.....	7
IV. Resultados.....	9
V. Discusión.....	10
VI. Conclusión.....	11
VII. Bibliografía.....	12

I. RESUMEN

La presente Tesis se llevó a cabo, con el objetivo de separar los espermatozoides "X" e "Y" del semen de conejo a través de su filtración en columnas de Sephadex.

Se utilizaron 12 conejas de la raza Nueva Zelandia sexualmente maduras y 2 conejos fértiles de la misma raza, edad y peso que las hembras. Las conejas se dividieron en cuatro grupos de tres animales cada uno. El semen se obtuvo mediante vagina artificial. Tres de los grupos de conejas fueron inseminadas artificialmente con las fracciones resultantes del semen de conejo filtrado a través de columnas de Sephadex. Los grupos I, II y III se inseminaron con las fracciones primera, intermedia y final del filtrado respectivamente. El grupo IV permaneció como testigo inseminándose con semen sin filtrar.

En las conejas inseminadas con la fracción final del filtrado, fue el único grupo donde se observó una desviación en la relación de los sexos (40:60) de los productos de acuerdo a la hipótesis sustentada.

Los resultados obtenidos no se sometieron a análisis estadístico debido al reducido número de animales de que se dispuso.

II. INTRODUCCION

Hace ya más de medio siglo que se realizan investigaciones orientadas a influir en el sexo del producto antes de la concepción, con este propósito gran número de experimentos de la -- más diversa índole se han llevado a cabo con -- semen de mamíferos de diferentes especies (1, - 4, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, - 21, 22, 24). Estos ensayos han tenido como finalidad separar los espermatozoides "X" de los "Y" llamados también Gino- y Androespermatozoides respectivamente. Al lograrse una excitosa separación de los espermatozoides "X" e "Y" -- con mínimo deterioro de su capacidad fecundante, puede afirmarse que con ello implícitamente estaría lográndose influir también en el -- sexo del producto antes de la concepción. Esto además de la gran trascendencia que tuviese en genética humana abriría nuevas posibilidades -- de organización económica y zootécnica en el -- campo de la producción animal. En ganado vacuno tiene particular importancia la diferencia entre los sexos, de tal manera que se prefie--ren machos cuando se trata de producir anima--les para abasto debido a su mayor capacidad de crecimiento, mayor rendimiento en canal y me--nor grado de engrasamiento (25); en hatos le--cheros es obvio que se desee tener una predominancia en el número de pariciones de becerras, pues así se asegura el hato de reposición, se acorta el intervalo entre generaciones y se -- aumenta la intensidad de selección (25).

Algunos de los métodos de separación de andro- y ginoespermatozoides que con mayor frecuencia se han utilizado son:

- a) Centrifugación
- b) Sedimentación
- c) Electroforésis
- d) Inmunización
- e) Tratamiento con sustancias químicas
- f) Combinación de los procedimientos anteriores.

- a). Centrifugación.- El empleo de la fuerza -- centrífuga como medio para separar Andro- y Ginoespermatozoides se fundamenta en las diferencias que existen entre unos y otros en cuanto a su peso específico (15). Esta técnica ha demostrado no ser de utilidad - en la práctica debido al gran daño que sufren los gametos como consecuencia de las aglutinaciones que se presentan (13,14).
- b). Sedimentación.- El principio de este procedimiento se basa en la deposición pasiva y por estratos de los espermatozoides, según sea su peso específico; esto se lleva a -- cabo a través de un medio especial de viscosidad determinada contenido en una bureta; en donde el movimiento propio de las - células germinales es inhibido por encontrarse a 0°C en baño maría. Este procedimiento fue utilizado de igual manera o ligeramente modificado por la mayoría de investigadores que se avocaron a la separación de Andro- y Ginoespermatozoides mediante sedimentación. Utilizando esta técnica y un aparato llamado batería de sedimentación (25), científicos de Alemania Democrática, al trabajar con semen de bovino lograron una desviación en la relación de los sexos en una proporción aproximada de 70:30 sobre un total de 58 productos (10). Sin embargo el método ocupa mucho tiempo y

personal, la proporción de eyaculado útil después de su procesamiento es de aproximadamente el 15%, no es posible estandarizar el medio de sedimentación y cada eyaculado ha de probarse empíricamente hasta ajustarlo.

- c). Electroforésis.- Los experimentos llevados a cabo mediante este principio parten del supuesto de la diferencia de cargas, que existen en el potencial de membrana, entre Andro y Gienoespermatozoides. Así, al someter semen a un campo eléctrico los espermatozoides migrarán al ánodo o al cátodo según sea su carga eléctrica (22, 24). Por los resultados contradictorios obtenidos puede inferirse que el potencial de carga no siempre es constante en los gametos (25). Es también importante hacer notar el daño que sufren las células germinales al ser sometidas a electroforésis.
- d). Inmunización.- Hoy en día los trabajos sobre separación de espermatozoides "X" e "Y" en cuanto a posibles diferencias inmunológicas se basan en el reciente descubrimiento del antígeno H-Y, cuyo gen codificador se asienta sobre el cromosoma "Y" de las células de humanos y ratones (26). No se dispone de información sobre la existencia del antígeno H-Y en otras especies.
- e). Tratamiento del Semen con Substancias Químicas.- Este tratamiento consiste en hacer actuar sobre el semen a substancias tales como: hormonas, ácidos, álcalis, soluciones hipotónicas e hipertónica, enzimas, etc. Cualquiera que sea la substan

cia empleada se busca, que ésta dañe selectivamente a uno de los dos tipos de espermatozoides mientras implícitamente favorece la capacidad fecundante del otro. El tratamiento del semen con enzimas es el -- que mejores resultados ha dado. La acción de la Asparginasa sobre semen de conejo -- dió lugar a 56% de hembras de un total de 248 productos, mientras que de la acción -- de la Esterasa se obtuvieron 58.2% de machos de un total de 248 productos (16).

f). Combinación de Procedimientos.

- 1.- En un experimento realizado por Knaack et. al., donde se emplearon conjuntamente las técnicas de Sedimentación y Electroforésis para el procesamiento de semen de bovino, se alcanzó una desviación en la relación de los sexos, -- de más de 65% de un total de 2358 productos nacidos (9). Este método presenta la ventaja, que el semen puede ser congelado y almacenado hasta su -- uso. Sin embargo este doble procesamiento resulta demasiado caro y laborioso para lograr una aceptación en la práctica. Aún más, en un trabajo realizado en Holanda se trató de comprobar los resultados obtenidos por los -- investigadores arriba mencionados pero sin lograr el éxito esperado (8).
- 2.- En otro trabajo donde se combinaron -- las técnicas de electroforésis e inmunización se sometió semen de conejo a electroforésis esperando colectar un -- mayor número de Androespermatozoides -- en el cátodo y una población predominante de Ginoespermatozoides en el áno

do. Antes de inseminar a las conejas se les inyectó una suspensión de Anodo-espermatozoides y a este hecho se le llamó Anodo inmunización activa. A -- otras conejas antes de servir las se -- les inyectó suero de conejas que previamente habían sido tratadas con Anodo-espermatozoides a este procedimiento se le denominó Anodo-inmunización pasiva. De manera análoga se procedió para la Catodo-Inmunización de las demás conejas. De este trabajo sólo se logró tener éxito con las conejas inmunizadas pasivamente; obteniéndose -- 84% de productos hembras de las madres tratadas con el antisuero de semen catódico y 89% de gazapos machos de las madres tratadas con el antisuero de semen anódico. Sobre el número total de machos y hembras paridas no se proporcionan datos (22).

- 3.- También mediante el empleo conjunto de resinas de intercambio iónico y filtración se ha tratado de separar a los espermatozoides "X" e "Y" sin llegarse a resultados alentadores. (8).

Separación de Espermatozoides "X" e "Y" por -- Filtración a través de Columnas de Sephadex.

Antecedentes.- Graham et. al. aprovechando las propiedades físico químicas del Sephadex (18) desarrollaron un método en el que por medio de filtración de semen de carnero a través de columnas de Sephadex les fue posible separar poblaciones de espermatozoides móviles de las de inmóviles o muertos (7); la técnica también ha sido utilizada con éxito en investigaciones recientes con semen de verraco y toro (3,6). En

base a lo anterior y partiendo del supuesto -- que existen diferencias entre Andro y Ginoes -- espermatozoides en cuanto al tamaño y veloci-- dad de movimiento (21), se decidió realizar el presente ensayo.

El objetivo de esta investigación es separar - los espermatozoides "X" e "Y" del semen de co- nejo por filtración a través de columnas de -- Sephadex.

III. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 12 conejas de la raza Nueva Zelandia, sexualmente maduras, de cinco meses de edad, con un peso promedio de 4 kg. y procedentes del bioterio de la Granja "Veracruz" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.; se dispuso también de dos conejos de la misma raza, edad, peso y procedencia que las hembras. Las conejas se dividieron en cuatro grupos de tres animales cada uno, designados como grupo I, II, III, IV. Los animales se alojaron en el mismo local en jaulas individuales y se les mantuvo bajo el mismo régimen alimenticio a base de alimento concentrado.

La preparación del Sephadex y las columnas se realizaron según la técnica de Grahm et. at. - (7) La colección de semen se realizó mediante la vagina artificial utilizando una coneja como estímulo para incitar al macho a montar. -- Para conservar la viabilidad del semen éste se mantuvo en baño maría a 36°C. La observación microscópica del movimiento del semen se realizó inmediatamente después de la colección y -- de la dilución de las diferentes fracciones -- del eyaculado. Para la dilución se usó leche descremada. Se depositaron 3 cm³ de semen diluido sobre cada una de las columnas de Sephadex. Al filtrado del primer ml. que descendió de la columna se le denominó primera fracción. Con esta fracción obtenida de cada una de las columnas se procedió a la inseminación artificial del grupo de conejas número I. Con la -- fracción intermedia resultante del segundo ml. de semen filtrado se inseminó a las conejas -- del grupo número II. Con la fracción final obtenida de la filtración del semen se inseminó a las conejas del grupo número III. Inmediata-

mente antes de la inseminación de cada coneja con las fracciones ya filtradas, se observó - que el movimiento individual de los espermatozoides no estuviera inhibida. El movimiento - del semen filtrado fue de 85%. Inmediatamente después de la inseminación artificial de todas las conejas se les inyectó a cada una 100 U.I. de Ganodotropina Coriónica Humana vía vena vaginal de la oreja con el objeto de inducir la ovulación. El grupo de conejas número IV sirvió como grupo testigo. A estas hembras se -- les inseminó con el semen diluido sin filtrar, el cual al momento del servicio presentó 80% - de movimiento. La ovulación se indujo de mane-- ra similar a como se procedió con las conejas de los otros 3 grupos. La dosis de insemina-- ción fue aproximadamente de 1.5×10^6 de esper-- matozoides en el semen filtrado mientras que - la dosis en el semen sin filtrar fue de alrede-- dor 1.5×10^8 /ml. de semen.

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro siguiente:

Efecto del semen de conejo filtrado a través de columnas de Sephadex sobre la distribución del sexo de los productos.

GRUPO	FRACCION	PRODUCTOS			MACHOS	HEMBRAS
		TOTAL	MACHOS	HEMBRAS	%	%
I	Primera	20	9	11	45	55
II	Intermedia	25	10	15	40	60
III	Final	20	8	12	40	60
IV	Sin filtrar	24	14	10	58.33	41.67

V. DISCUSION

El cuadro muestra que las conejas inseminadas con la primera fracción del filtrado parieron 45% de productos machos contra 55% hembras. -- Esta distribución de los sexos no corresponde a lo esperado según muestra hipótesis de acuerdo a la cual los Androespermatozoides por su menor tamaño y mayor capacidad de movimiento frente a los Ginospermatozoides serían los -- que en mayor proporción se colectarían en la -- primera fracción del filtrado y por lo tanto -- supuestamente tendrían mayor probabilidad de -- fecundar a los ovocitos, dando como resultado el nacimiento de una mayor proporción de machos. Sin embargo las conejas inseminadas con la fracción final de filtrado, en el que supuestamente se encontrarían mayor cantidad de espermatozoides X, dieron a luz 60% de crías hembras contra 40% de machos lo que está de -- acuerdo con nuestra hipótesis de que los espermatozoides X por su tamaño y menor capacidad de movimiento serían los que en mayor proporción se encontrarían en la fracción final, conduciendo así a un mayor número de gazapos machos en las hembras inseminadas con dicha fracción. En las hembras inseminadas con la fracción intermedia del filtrado se esperaba una relación de los sexos de 50:50% no obstante -- los resultados obtenidos fueron 40% machos y 60% hembras.

De los resultados obtenidos no es posible inferir que realmente tuvo lugar una separación de los espermatozoides "X" e "Y", incluso en el caso de la fracción final, ya que debido al -- poco número de conejas de que se dispuso y al poco número de productos obtenidos no fue posible someter los resultados a un análisis estadístico.

VI. CONCLUSIONES

Mediante la técnica utilizada en este trabajo no fue posible modificar en un alto grado la relación del sexo de las crías. Esto significa que probablemente no se efectuó una separación de espermatozoides "X" e "Y" de acuerdo a la hipótesis sustentada.

Para tener un fundamento estadístico de -- hasta que punto es posible lograr una desvia-- ción en la relación del sexo de los productos mediante la filtración de semen de conejo en-- Sephadex, se sugiere repetir el experimento -- con un número mayor de animales.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- BENEDICT, R.C., SCHUMAKER, V.N. and DAVIES, R.E.: The bouyant density of bovine and -- rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fert., 13: 237-249. (1967).
- 2.- BHATTACHARYA, B.C.: Die verschiedene Sedi-
mentationsgeschwindigkeit der x-und y --
-Spermien un die Frage der willkürlichen -
Geschlechts bestimmung. Z. Wiss.Zool., --
14: 355-363. (1962).
- 3.- DUCHATEAU, B.A., GRAHAM, E.F., EVENSEN, --
B.K. y SCHMEHL, M.K.: Separación de esper-
matozoides móviles e inmóviles en Semen de
Bovino por medio de filtración en Columnas
de Sephadex y su Efecto en la producción -
de Spermatozoides Anormales antes y des-
pués del congelamiento. X Congreso Mundial
de Buiatría, México (1980).
- 4.- EMMENS, C.W.: InseminationpH and the sex -
ratio in rabbits. J. Heredity., 51: 156-157
- 5.- ERICSON, R.J., LANGEVIN, C.N., and NISHINO,
M.: Insolation of fraction rich in human y
sperm. Nature., 246: 421-424. (1973).
- 6.- FAYEMI, E.O. CRABO, B.G. and GRAHAM, E.F.:
Assay of frozen boar semen with sephadex -
filtration. Theriogenology 12: 13-17 (1979)
- 7.- GRAHAM, E.F., VAZQUEZ, I.A., SCHMEHL, M.K.
and EVENSEN, B.K.: An assay of semen qua-
lity by use of sephadex filtration. VIII -
Congreso Internacional de Producción Ani-
mal e Inseminación Artificial. Krakovia -
Polonia. (1976).
- 8.- HANN, R., LANG, L. ORRMAN, W., MERKT, H. -
RUNDFELDT, H. and ZODER, F.: Versuche zur

- Geschlechtsbestimmung am Bullensamen. --
Deutsche Tierärztl. Wochr. 82: 5-10 (1975)
- 9.- KNAACK, J. y EBERTUS, R.: Einsatz pelle--
tierter Spermien und deren Beziehungen --
zur Fruchtbarkeit. Tierzucht 26: 166-168.
(1972).
 - 10.- KNAACK, J., NEHRING, H. and LORENZ, G.: -
Neue Ergebnisse der experimentellen - -
willkürlichen Geschlechtsbeeinflussung --
beim Rind. Tierzucht. 4: 156-159 (1973).
 - 11.- KORDTS, E.: Untersuchungen über die Eig--
nung der Elektrophorese zur Tränhung der
männchen-und weibchenbestimmenden Sper- -
mien bei Kaninchen. Z. Tierzucht. Zucht.-
Biol., 60: 221-240 (1952).
 - 12.- KRAJNC, A.: Biometrische Untersuchungen -
an Bullen spermien und deren Beziehungen
zur Fruchtbarkeit. Tesis de doctorado. --
Esc. Sup. Med. Vet. Hannover. Alemania --
Federal (1964).
 - 13.- LINDHAL, P.E.: Separation of bull sperma-
tozoa carrying x-and y-chromosoms by --
counter-streaming centrifugation. Acta --
agric. Scand. 8: 226-230 (1958).
 - 14.- LUSH, J.L.: The possibility by artificial
insemination with centrifugated spermato-
zoa. J. Agric. Res., 30: 893-913 (1925).
 - 15.- ORESNIK, A.: Die spezifischen Gewichte --
der Spermien verschiedener Haustieren und
die Beziehungen zur Geschlechtsspezifität
der Samenzellen. Tesis de doctorado. Esc.
Sup. Vet. Hannover. Alemania Federal --
(1969).
 - 16.- PADMA, R.S., UMASHASHI, C.H. y SHANTAS, -
R.: Use of ficoll-Sodium Metrizoato --
density gradient to separate human-x and-y

- bearingspermatozoa. Nature, 269: 58-60 (1977).
- 17.- PETAC, D.: Untersuchungen über geschlechtsspezifisches Verhalten von Samenzellen nach Behandlung von Ejakulaten mit chemischen Substanzen und die Auswirkungen auf das Geschlechtsverhältnisses bei Kaninchen und Schwein. Tesis de doctorado Esc.Sup.Med.Vet. Hannover. Alemania Federal.
 - 18.- PHARMACIA FINE CHEMICALS.: Sephadex-gel - filtration in theory and practice. Folleto (1973).
 - 19.- ROBERTS, A.M.: Gravitational separation of x- and y spermatozoa Nature, 238: 223-225 (1972).
 - 20.- ROSS, A., ROBINSON, J.A. and EVANS, H.J.: Failure to confirm separation of x- and y-bearing sperm using B.S.A. gradients. Nature, 253: 354-355 (1975).
 - 21.- SCHILLING, E., HAZBEC, I. SCHMID, P.: Grosse un Geschwindigkeit der Samenzellen von Rind un Schaf un deren möglichen Beziehungen zum Geschlecht, Z. Tierzucht. Zücht. Biol., 83: 331-339 (1967).
 - 22.- SCHROEDER, V.: Über die biochemischen und physikalische Eigentümlichkeiten der x und y- Spermien. Z. Tierzucht. Zücht. Biol., 50-16-23 (1941).
 - 23.- SCHROEDER, V.: The role of metabolism of the parents on the sex ratio of the progeny. Anim. Bredd. Abst., 25: 191-192 (1957).
 - 24.- SHISCHITO, S., SHIRAI, M. and SASAKI, K.: Galvanic separation of x-and y-bearing human spermatozoa. Int. J. Fertil., 20-13 16 (1975).

- 25.- TEWES, H.: Probleme und Anwendungsmö- -
glichkeiten der Beeinflussung der --
Geschlechtsverhältnisses bei Haustieren. --
Tesis de Diploma. Instituto de Genética
y Cría Animal de la Universidad de --
Göttingen Alemania Federal (1973). --
- 26.- WACHTEL, S.S. OHNO, S., KOO, C.G. y --
BOYSE, A.E.: Possible role for H. Y --
antigen in the primary determination of --
sex, Nature, 257: 235-236 (1975).