

14



**ANALISIS COMPARATIVO DEL CONTENIDO DE DNA EN
ESPERMATOZOIDES DE TORO Y CERDO POR MEDIO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

De la

Universidad Nacional Autónoma de México
Para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

MARIA ISABEL CRUZ GONZALEZ

Dr. Salvador Romo García
Dr. Humberto González Márquez
Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

México, D.F.
2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

El presente trabajo se realizó
gracias al apoyo de
PAPIIT No. IN-224198 en la UMAM
FOMES No. 98-35-28 por parte de la UAM-I
Y CONACYT

II

DEDICATORIA

A Dios por que ha sido el motor de mi vida
y de todos mis esfuerzos.

A mis padres por todo el amor y la fe que han
depositado en mi, gracias por su confianza.

A mis amigos que siempre han creído en mi
y me han dado la mano cuando mas lo necesite.

A mis tres angelitos ale, ivan y mari fer
que Dios me dio como inspiración y fuente de amor.

A mis hermanos por enseñarme a soñar
y lograr mis metas.

A ti Carlos por tu confianza, apoyo y sinceridad
Gracias por hacerme sentir grande cuando logro avanzar
Gracias por hacerme no perder el suelo cuando tengo miedo.

Gracias a mis asesores por permitirme aprender de ellos.

Gracias a todos los que me han enseñado algo en el camino.

III

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Salvador Romo García por su apoyo desde el primer día en que nos conocimos, por la confianza depositada en mi. por enseñarme un nuevo camino para enfocar mi carrera.

Al Dr. Humberto González Márquez por todo su apoyo, por su trabajo, su paciencia y sobre todo por sus conocimientos, gracias por ser mi asesor y mi amigo.

A la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz por tener la paciencia de escucharme cuando requerí de su tiempo y por su apoyo durante la tesis.

A la M. en C. Edith Cortés Barberena por su apoyo incondicional durante todo el tiempo que duro el trabajo experimental y por su amistad, por sus conocimientos y su paciencia.

A la Dra. Reyna Fierro Pastrana por permitirme desarrollar este tema de tesis.

Al Dr. Miguel Betancourt Rule por darme la oportunidad de integrar a su laboratorio.

A todos los doctores, maestros y estudiantes con los que compartí el laboratorio, gente que no solo fue guía en el desarrollo de mi tesis, sino que fueron amigos que me apoyaron y reprendieron cuando fue necesario.

Gracias a todos por su apoyo.

IV

INDICE

Páginas

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	V
INDICE DE CUADROS.....	X
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Cuantificación del DNA intracelular.....	3
La citometría de flujo.....	6
Aplicaciones de la Citometría de Flujo (CF).....	1
Parámetros de calibración utilizados en citofluorometría de flujo.....	1
Estándares y Controles:.....	1
Cuantificación de DNA Celular.....	1
Identificación del cromosoma y por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	1
Método inmunológico del análisis de DNA.....	2
Fluorocromos.....	2

Historia del sexado espermático.....	2
El sexado espermático por citometría de flujo.....	2
Hipótesis.....	2
OBJETIVOS.....	2
Objetivo General.....	2
Objetivos Específicos.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	3
Lugar.....	3
Fechas.....	3
Equipo.....	3
Material de laboratorio.....	3
Material biológico.....	3
Medios, Sustancias y Fluorocromos.....	3
METODOLOGÍA.....	3
Preparación de reactivos y soluciones.....	3
Preparación de la Solución Buffer de Fosfatos de Dulbecco (PBS).....	3
Preparación del amortiguador TNE.....	3
Preparación de Albúmina Sérica Bovina fracción V (BSA).....	3
Preparación de fluorocromos.....	3
Preparación del IP.....	3
Preparación del NA.....	3

VI

Preparación del SG	3
Calibración del FACSCALIBUR de Becton-Dickinson (BD).....	3
Procesamiento de muestras sanguíneas.....	3
Calibración para el análisis de DNA	3
Obtención de la muestra de semen de toro y cerdo.	4
Procesamiento de las muestras	4
Procesamiento de las pajillas de Toro.....	4
Procesamiento de las muestras de semen fresco de Cerdo.....	4
Lavado de las muestras	4
Técnicas de tinción	4
Tinción con IP	4
Tinción con NA.....	4
Tinción con SG.....	4
RESULTADOS.....	4
Calibración del citofluorómetro.	4
Estandarización para la cuantificación del DNA en citometría de flujo.....	4
Determinación de la zona de localización de los espermatozoides toro y cerdo.	4
Determinación del contenido de DNA de espermatozoides bovinos y porcinos mediante fluorocromos específicos para DNA.....	5
Muestras teñidas con IP	5
Muestra de toro teñidas con IP.	5

VII

Muestras de cerdo teñidas con NA	5
Muestras de toro teñidas con NA	5
Muestras de cerdo teñidas con SG	6
Muestras de toro teñidas con SG.	6
Tratamiento estadístico de los resultados.....	6
DISCUSIÓN.....	7
CONCLUSIONES.....	7
Perspectivas.....	7
BIBLIOGRAFIA	7
ANEXO I	8

INDICE DE FIGURAS

Páginas

Figura 1 . Configuración óptica de un CMF basado en una sistema de iluminación con láser.....	11
Figura 2. Espectros de emisión y compensación o sustracción de señal con perlas de calibración.....	13
Figura 3a. Gráfica de puntos de sangre completa, se observa marcado con el 1 la región de los linfocitos, con el 2 a los granulocitos y con el 3 a los monocitos. 3b. Gráfica de puntos donde se muestran linfocitos aislados por medio de un gradiente de Linfograd.....	46
Figura 4 Gráficas de CEN teñidos con IP. 4a. Se grafico el ancho de la fluorescencia 2 (FL2W) contra el número de los eventos, con esta gráfica se modifica la ganancia en el amperaje hasta obtener un valor de 200 ± 5 . 4b. Histograma del área de la fluorescencia 2 (FL2-A) con el que se ajusta el voltaje hasta obtener un valor de 200 ± 5 , para luego obtener el coeficiente de variación y la linealidad de la medida. 4c. Gráfica de puntos donde se muestran núcleos de timocitos de ternera (CTN) de FL2-W vs FL2-A en dónde se determina la región en el cual se cuantificaron los núcleos solos.....	48
Figura 5a. Muestra de espermatozoides de cerdo adquiridos con la finalidad de analizar los parámetros FFC y SSC en forma logarítmica, separando en una región correspondiente a la población de los espermatozoides encerrada en una elipse. 5b. Gráfica de puntos de espermatozoides adquiridos en forma lineal es posible observar una	

VIII

- población mayor a comparación con lo que se observa en la adquisición de la muestra en forma log.....49
- Figura 6a Muestra la distribución de los espermatozoides de toro adquiridos con parámetros logarítmicos, en la que es posible determinar a la región correspondiente a los espermatozoides delimitada por el elipse. Figura 3b Gráfica de puntos con parámetros lineales donde es posible observar una región más clara de espermatozoides.50
- Figura 7a Adquisición de espermatozoides de cerdo en forma lineal. Se observa la dispersión de igual manera que en la adquisición sin colorante, seleccionando la región encerrada en un elipse donde se localizan los espermatozoides, la cual sirvió para localizarla en el gráfico del ancho (W) y área (A) de fluorescencia.7b Se observa un grupo más homogéneo y localizable. En el cual es posible notar dos subpoblaciones que en teoría corresponden a las dos subpoblaciones de espermatozoides que contienen el cromosoma X o al cromosoma Y,.....53
- Figura 8a. En el histograma se muestra la fluorescencia de la población de espermatozoides de la región seleccionada en la gráfica de puntos, en el cual no es posible observar las dos subpoblaciones de espermatozoides bien delimitadas. 8b. Histograma que muestra el ancho de la fluorescencia debida al IP, es posible observar dos picos que podrían corresponder a dos poblaciones.....54
- Figura 9a, Gráfica de puntos donde se muestra la disposición de la población analizada de acuerdo a su tamaño y granulosidad (FSC vs SSC). 9b Gráfica en la que se muestra la disposición de la población espermática de acuerdo al ancho y al área de la fluorescencia

IX

- emitida (IP-W vs IP-A respectivamente) por el material genético de los espermatozoides de toro empleados para este análisis.....55
- Figura 10a. El histograma muestra la región correspondiente a los espermatozoides seleccionados en el gráfico de puntos, permitiendo observar la presencia de dos picos demasiado unidos, lo que dificulta la posibilidad de separarlos para someterlos a proceso de selección y recuperación celular. 10b. Muestra otra perspectiva acerca de la misma región, siendo más clara la presencia de dos picos.....56
- Figura 11a. Gráfica de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides de cerdo teñidos con NA, tomando en cuenta los parámetros de granulosidad y tamaño de las células analizadas (FSC-SSC). 11b. Se observa el análisis de los espermatozoides de cerdo teñidos con NA tomando los parámetros de ancho y área de la fluorescencia (NA-W / NA-A.).....57
- Figura 12a El histograma es obtenido a partir de la información proporcionada por la gráfica de puntos donde se localizó la región de los espermatozoides. Es posible observar dos picos que corresponden posiblemente a dos poblaciones de espermatozoides. 12b. Histograma que muestra el ancho de la fluorescencia debida al NA. No es posible determinar una separación de espermatozoides en dos poblaciones.58
- Figura 13a. Gráfica de puntos de acuerdo a la granulosidad y tamaño de las células. Es posible observar una distribución similar a la que presentan las muestras de cerdo. 13b. Gráfica de puntos de acuerdo al ancho de la fluorescencia del NA intercalado en el DNA de los núcleos de los espermatozoides. La dispersión de los puntos se muestra de forma

extendida, lo cual dificulta la localización del un grupo representativo de espermatozoides no agregados.....59

Figura 14a. Histograma obtenido a partir del gráfico de puntos donde se localizó la región de los espermatozoides. Es posible observar la presencia de dos picos que posiblemente corresponden a dos poblaciones de espermatozoides, a pesar de la distancia tan marcada que presentan, debido a que por presentar una diferencia de solo el 4% entre los que contienen el cromosoma X y el Y, deben presentarme más unidos los picos. 14b Histograma en el cual es posible observar la presencia de dos picos que posiblemente corresponden a dos poblaciones.....60

Figura 15a. Gráfica de puntos, en ella es posible observar una disposición similar a la que se observa en las muestras teñidas con IP o NA. 15b. Gráfica de puntos donde se tomó como parámetro el ancho de la fluorescencia, se observa una disposición similar a la observada con las muestras teñidas con IP. De ésta gráfica se tomó la región de los espermatozoides no agregados para su análisis en los histogramas.....61

Figura 16a. El histograma es obtenido a partir de la información proporcionada por el gráfico de puntos donde se localizó la región de los espermatozoides. Es posible observar dos picos que podrían corresponder a dos poblaciones de espermatozoides, aunque es muy notoria su separación, la cual haría dudar de la veracidad de que sean dos poblaciones. 16b. Histograma que muestra el ancho de la fluorescencia debida a SG. Es posible observar una separación de espermatozoides en dos poblaciones por la presencia de los picos.....62

XI

Figura 17a. Gráfica de puntos, es posible observar una disposición similar a la que se observa en las muestras teñidas con IP o NA. 17b. Gráfica de puntos tomando como parámetros la fluorescencia, se observa una disposición similar a la observada con las muestras teñidas con IP, aunque se observan dos grupos de puntos, de éste gráfico se tomó la región de los espermatozoides no agregados para su análisis en los histogramas.....63

Figura 18a. El histograma es obtenido a partir de la información proporcionada por la gráfica de puntos donde se localizó la región de los espermatozoides. No es posible observar dos picos bien definidos que correspondan a dos poblaciones de espermatozoides, 18b. Histograma que muestra el ancho de la fluorescencia debida a SG, es posible observar una separación de espermatozoides en dos poblaciones por la presencia de los picos, aunque es muy notoria su separación, la cual haría dudar de la veracidad de que sean dos poblaciones.....64

Figura 19 Distribución PLATICURTICA de dos poblaciones por simetría y curtosis.....69

INDICE DE CUADROS

Páginas

Cuadro 1. Parámetros que se pueden estudiar por medio de CF en células eucariontas.....8

Cuadro 2. Análisis comparativo de varias especies dependiendo de la diferencia en porcentaje de su contenido de DNA entre los espermatozoides que contiene el cromosoma X y los que contienen el cromosoma Y.....16

Cuadro 3. Fluorocromos empleados para el análisis de DNA, presentando las longitudes de onda a las que absorben y emiten fluorescencia. Datos de Molecular Probes (<http://www.probes.com>).....25

Cuadro 4 Valores de curtosis de cada muestra con los diversos colorantes. Muestras los valores de cada una de las muestras analizadas y teñidas con los diferentes fluorocromos empleados para observar el contenido de DNA de los espermatozoides. Como se puede observar todos los valores obtenidos, ya sea en forma independiente o en promedio por especie y colorante, son menores a cero, lo que indica que la distribución que presentan es platicurtica.....66

RESUMEN

CRUZ GONZALEZ MARIA ISABEL

Análisis comparativo del contenido de DNA en espermatozoides de toro y cerdo por medio de citometría de flujo

Bajo la dirección de los doctores

Dr. Salvador Romo García
Dr. Humberto González Márquez
Dra. Alda Rocío Ortíz Muñiz

El presente trabajo tuvo por objetivo implementar una técnica para separar espermatozoides con el cromosoma X o con el cromosoma Y, en toros y cerdos, basado en la cuantificación del contenido de DNA por citometría de flujo (CF), mediante un sistema FACScalibur (Becton Dickinson), utilizando colorantes no vitales como el Yoduro de Propidio (IP) y Naranja de Acridina (NA) y uno vital, Syto Green (SG). Los espermatozoides fueron lavados con PBS (Amortiguador Salino de Fosfatos), sacrificados por choque térmico, teñidos, incubados y analizados en el citómetro a velocidad baja. La región de espermatozoides fue determinada y analizada en gráficas de puntos de tamaño vs. granulosidad y la fluorescencia en histogramas de frecuencia. Los espermatozoides seleccionados y recuperados fueron colectados para volverlos a analizar en el CF. Los datos obtenidos fueron procesados con el programa Statistical Analysis System (S.A.S.) para determinar el tipo de distribución, curtosis y simetría de la población espermática. Los resultados indicaron que la población de espermatozoides presentaba una distribución con dos medias, correspondientes a dos poblaciones diferentes en contenido de DNA, aunque al encontrarse tan cercanas entre sí su aislamiento fue difícil. No se pudieron realizar pruebas específicas como la técnica de PCR, para confirmar la presencia exclusiva de espermatozoides X o Y, sólo fueron corroborados los resultados estadísticamente. Este trabajo permitió determinar las concentraciones óptimas de los fluorocromos, dosis de espermatozoides por muestra, velocidad de análisis y la región donde se localizan los espermatozoides, datos que serán útiles en futuros trabajos para confirmar la determinación del sexo y viabilidad de los espermatozoides analizados por citometría de flujo.

INTRODUCCIÓN

La presencia de cromosomas sexuales en los espermatozoides se reconoció desde principios del siglo XX, esto permitió la realización de estudios relacionados con los elementos genéticos y su aplicación en los procesos reproductivos, citado en Seidel en 1999 (1). Este suceso repercutió en muchos campos del conocimiento biológico así como en los procesos de inseminación artificial y el desarrollo de la fertilización in vitro El sexado espermático, (esto es, la identificación del tipo de cromosoma sexual presente en un espermatozoide), tiene como finalidad obtener progenie de un sexo predeterminado, lo que permitirá mayores ganancias a la industria ganadera (2-4).

Hasta la fecha se han desarrollado distintas técnicas para obtener poblaciones de espermatozoides de un solo sexo (5). La técnica que mejores resultados ha dado para el sexado espermático es la citofluorometría. La selección de espermatozoides por este método tiene como característica principal la de ser de alta velocidad, favoreciendo los programas reproductivos al utilizar citofluorómetros adaptados especialmente para realizar el sexado espermático (6, 5).

Se ha observado que, después de la selección espermática, la fertilización in vitro (FIV) es la mejor opción para el uso del semen sexado seguida de la inseminación intrauterina (IIU), la inseminación artificial convencional (IA), y en último lugar, la microinyección espermática (ICSI). Esto debido sobre todo al bajo número de espermatozoides obtenidos en las técnicas de sexado y a la gran cantidad de espermatozoides requeridos para las últimas técnicas

aunque la utilización de la primera implique mayor capacitación del personal a cargo de la FIV. En el futuro, el uso de semen congelado, además del fresco, incrementará el valor agregado de la selección espermática en la industria ganadera ya que será una opción más para mejorar la progenie tanto por la selección de los mejores sementales como por el hecho de obtener crías del sexo necesario para la producción (5).

En los laboratorios donde se han utilizado citómetros de flujo, con selectores de alta velocidad modificados para su uso con espermatozoides y con la adaptación de boquillas orientadoras se han podido seleccionar 11×10^6 espermatozoides/hora con una pureza del 85 al 90% (5). Algunos autores hablan de un rendimiento de selección menor, que va de los 3×10^5 a 4×10^5 espermatozoides/hora (1, 7). Se ha determinado que de forma rutinaria, este proceso permite obtener en promedio 6×10^6 espermatozoides de cada sexo por hora, y se puede lograr en un plano rápido de selección hasta $18 \times 10^6/h$, aunque el grado de pureza de espermatozoides X seleccionados puros se reduce a 75% (5).

Cuantificación del DNA intracelular.

El DNA es la unidad primaria de almacenamiento de la información genética de una célula, pasando de ella a las células hijas por el proceso de replicación. El material genético rige la transmisión de todas las características morfológicas, fisiológicas y moleculares de los organismos. Aunque el DNA fue descubierto en los núcleos celulares, en 1869 por F. Miescher, no fue sino hasta 1944 cuando O. T. Avery y colaboradores lo identificaron como portador directo de la información genética de las células. La composición estructural del

DNA en el núcleo de las células eucariotas es muy compleja, experimentando grandes cambios durante el ciclo celular. Durante la interfase, el núcleo presenta un retículo irregular de cromatina, (denominada así por su afinidad a los colorantes básicos). Las fibras de cromatina constan de dos componentes principales que son el DNA y las proteínas básicas denominadas histonas. Además de las histonas, la cromatina contiene proteínas no histonas, que pueden ser enzimas como la DNA polimerasa, factores de transcripción, además de RNA nuclear y algunos lípidos. Se sabe que la cromatina representa mas del 95% del DNA presente en las células.

Durante la interfase, la cromatina se encuentra dispersa y ocupa la mayor parte del núcleo; y durante la división nuclear se condensa para formar los cromosomas compactos (citado por Lehninger, Bohinski y Callen) (8-10).

Durante la espermiogénesis la meiosis ocasiona que la cantidad de DNA pase a ser la mitad con relación al contenido en las células somáticas. Además, en los espermatozoides maduros, el núcleo haploide consiste casi totalmente de cromatina densamente empacada, compuesta de desoxirribonucleoproteína. Este cambio en densidad se lleva a cabo por la sustitución secuencial de las histonas somáticas por dos clases de proteínas básicas pequeñas específicas del testículo: las proteínas de transición (TPs) y las protaminas. Se piensa que este reemplazo secuencial de proteínas es el responsable de la represión de la actividad transcripcional del núcleo (11-14).

Se sabe que el DNA de la cromatina del núcleo somático esta empaquetado en nucleosomas, donde el DNA se enrolla 2 veces alrededor de un octámero de histonas cada 200 pares de

bases (pb), y en el caso de los espermatozoides se postula que las protaminas se intercalan a lo largo del surco de la doble hélice del DNA, y las cadenas del DNA se empaquetan lado a lado en un arreglo lineal (10).

En los últimos 10 años, varios grupos han desarrollado técnicas para investigar la organización del DNA en el núcleo de muchas especies, basada en la hibridación *in situ*.

Con base en las diferentes evidencias se ha establecido claramente que el núcleo de los mamíferos está altamente organizado y la evidencia indica que la replicación y la transcripción del DNA están restringidas topológicamente (15).

Existen dos técnicas principales para el estudio del contenido de DNA, que son: la fluorocitometría y el análisis de imágenes por medio de microscopía epifluorescente.

La primera consiste en la evaluación del contenido por medio de la unión de colorantes específicos que se intercalan en la doble hélice permitiendo ver una fluorescencia al pasar las muestras a través de un fluorocitómetro.

La segunda consiste en el análisis de imágenes tomadas a muestras donde se evalúa cuantitativamente la fluorescencia que emiten las células después de realizada una tinción *in situ* de las muestras determinando la fluorescencia emitida por medio de un analizador de imágenes (11, 16).

La citometría de flujo.

La investigación que realizó Chassoux en 1999 , muestra el panorama en el cual se ha desarrollado la citometría de flujo como un instrumento eficaz en el avance de la investigación en torno a las ciencias biomédicas. La citometría de flujo se inició en la década de los 60 como un avance importante en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas. Se define como citómetro de flujo al aparato que es capaz de medir componentes y propiedades de células y otras partículas biológicas, que fluyen en una suspensión. Los selectores o separadores celulares (sorters), tienen las mismas características y posibilidades que los citómetros de flujo pero con la capacidad adicional de separar las partículas selectivamente de la suspensión y recuperarlas para su utilización posterior (11).

Los parámetros que pueden determinarse por citometría de flujo (CF) se resumen en el Cuadro 1.

El primer contador celular automático fue desarrollado en 1934 por Moldavan el cual consistía en un tubo capilar por el que se hacían pasar células teñidas, el capilar estaba montado sobre un microscopio óptico con un objetivo sobre el cual había un detector fotoeléctrico que registraba el paso de células como un cambio en la luz que recibía. Este tuvo muchos problemas como diferencias en el grosor interno del capilar y obstrucción del mismo, así como dificultad en el mantenimiento de la presión; y años mas tarde en 1941

F a l t a

P á g i n a

7

Cuadro 1

ESTRUCTURALES	FUNCIONALES
Tamaño y forma celular	Estado Reducción - Oxidación
granulosidad citoplasmática	Estudio de membranas
Contenido de pigmentos	Actividad enzimática
Fluorescencia de proteínas	Endocitosis
Contenido DNA, RNA	Síntesis de DNA
Proporción de bases en el DNA	Receptores
Estructura de la cromatina	Potencial de membranas
Proteínas totales o básicas	pH, calcio, carga de superficie
Grupos químicos	
Antígenos	
Azúcares superficie	
Estructura del citoesqueleto	

Cuadro 1. Parámetros que se pueden estudiar por medio de CF en células eucariontas.

En 1949 W. Coulter desarrolló un contador celular basado en el cambio que produce una partícula al pasar por un agujero en el que hay una diferencia de potencial conocida, y en 1966 también usó cambios en ondas de radiofrecuencia para el mismo fin, citado por Caspersson en 1987 (18).

En 1953 Parker y Horst describen el primer contador diferencial hematológico usando células teñidas en rojo (hematíes) y azul (leucocitos), luz visible y detectores para luz roja o azul, citado por Caspersson en 1987 (18).

Y en 1965 Katmentsky introdujo dos importantes avances a la citometría:

- el uso de la espectrofotometría (luz absorbida) para cuantificar DNA
- la medida multiparamétrica de luz dispersada.

Además, fue el primero en emplear histogramas biparamétricos y, más tarde, desarrolló un sorter neumático. Con el tiempo, se fue introduciendo el empleo de sustancias fluorescentes que permitieron una mejor relación señal/ruido que los colorantes de absorción (17). Entre 1967-69 Van Dilla describe el primer citómetro de flujo con configuración ortogonal usando la cámara descrita por Crosland-Taylor. Demostrando con esto, la relación existente entre la ploidía y la intensidad de fluorescencia en la cuantificación de DNA, elaborando histogramas donde se pueden visualizar las fases del ciclo celular (G0, G1, fase S y G2+M) (19).

En 1965, Fulwyler describe el proceso de selección electrostático, basándose en la tecnología de las impresoras de inyección de tinta. Este es el principal sistema empleado en la actualidad (20-22).

Durante los años 60 y 70 se producen avances en la tecnología y su aplicación a la citometría de flujo, pero hasta final de los años 70 y principio de los 80 existían pocas aplicaciones de la citometría de flujo de interés biológico. Los esfuerzos se dirigían

principalmente a mejorar las características de los instrumentos que se estaban desarrollando (23).

Desde entonces, se han producido avances en la investigación médico-biológica con el uso de la citometría de flujo; Darzynkiewicz y Traganos entre 1976 y 1979 estudiaron el DNA y RNA con Naranja de Acridina. En 1983 Hedley estandarizó la técnica para el estudio del DNA en núcleos de muestras fijadas, utilizando la citometría de flujo. Muchos otros investigadores han contribuido, con sus experimentos, a desarrollar técnicas aplicables a la citometría de flujo, que ahora están dando frutos y se emplean tanto en el laboratorio de rutina, como en la investigación básica (24).

En la actualidad, los citómetros presentan un estructura muy similar a la ejemplificada en el diagrama de la Figura 1. El panel alto muestra la fuente láser y los detectores, y en el panel bajo, se muestra la cámara de flujo.

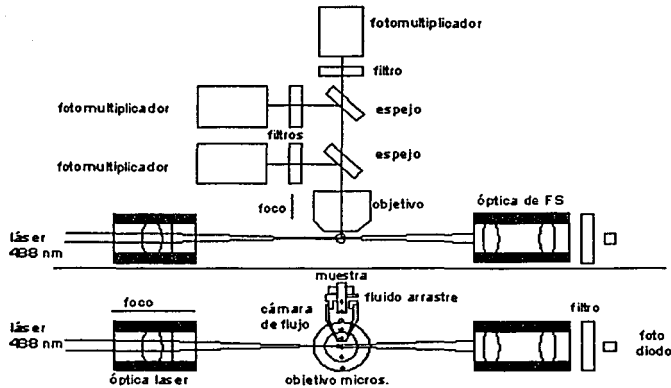


Figura 1. Configuración óptica de un CMF basado en un sistema de iluminación con láser

La calidad de los citómetros puede evaluarse en función de los siguientes parámetros:

- **Sensibilidad:** depende de la cantidad mínima de moléculas de fluorocromo que se puedan medir con precisión (resolución), lo que depende de: la luz que disperse, del índice de refracción e incluso del fluorocromo empleado. En general, la sensibilidad aumenta si se disminuye la velocidad de flujo (paso a través de la celda), manteniendo constante el diámetro del flujo interno (muestra).
- **Resolución (expresado como coeficiente de variación):** es la repetibilidad de la señal producida por células o partículas idénticas.
- **Velocidad de medida:** velocidad máxima en que las células pueden ser medidas sin exceder una frecuencia determinada de coincidencias (dos células detectadas como una

sola). En los citómetros que cuentan con un láser, la velocidad oscila alrededor de 5.000 células/segundo (25).

Aplicaciones de la Citometría de Flujo (CF)

La CF se puede emplear para estudiar características estructurales y funcionales de células o partículas en suspensión. La aplicación fundamental de ésta técnica se observa en el área de las ciencias biológicas y medicas en donde pueden identificarse antígenos celulares mediante inmunofluorescencia, el estudio del contenido de DNA y la determinación de las fases del ciclo celular (26, 27, 28).

Parámetros de calibración utilizados en citofluorometría de flujo.

Para el uso óptimo del citómetro de flujo es necesario tener un buen proceso de calibración del equipo, lo que permite obtener resultados más veraces en cuestión de investigación (25).

Estándares y Controles:

1.- Estándares (Patrones de normalidad): Un estándar es un material estable que tiene unos valores determinados de fluorescencia o dispersión de luz. Se usan para alinear o calibrar el citómetro de flujo. Existen comerciales o se les puede preparar en el laboratorio.

1.1.- Alineación: proporciona un método para detectar cambios y problemas en la configuración óptica y señal de un día a otro.

El CF se considera alineado cuando se consigue una elevada fluorescencia o señal con un bajo coeficiente de variación CV.

1.2.- Calibración (ajuste de escalas): El CF ofrecen una información relativa, para cuantificar hay que correlacionar los canales con resultados de muestras conocidas. El método más sencillo consiste en ajustar el voltaje del fotodetector (que produce cambios exponenciales, no-lineales o logarítmicos de la señal) y ganancias (crecimiento lineal) para conseguir un pico de una intensidad determinada.

1.3.- Compensación de colores: necesario cuando se emplean dos a más fluorocromos para marcar a las células en estudio, detectando la señal proporcional a la primera fluorescencia (FL1) en un detector, una segunda fluorescencia (FL2), etc. Los fluorocromos tienen espectros de emisión que en ocasiones se superponen, por ello los citómetros poseen un sistema informático de compensación o sustracción de señal. Figura 2.

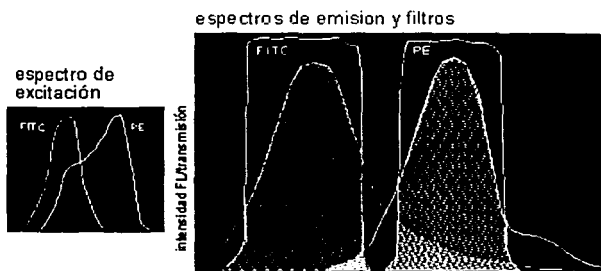


Figura 2. Espectros de emisión y compensación o sustracción de señal con perlas de calibración.

1.4.- Tiempo: se emplea como parámetro para graficar el número de células procesadas, el canal de fluorescencia, etc., en un periodo determinado, puede mostrar la estabilidad de las mediciones del citómetro y detectar la presencia de problemas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.- **Controles:** son muestras que produce resultados esperados (conocidos). Se usan para observar el buen funcionamiento de los reactivos y la calidad de los métodos de preparación celular. Son importantes en los análisis de DNA e inmunofluorescencia. Generalmente se usan controles de ploidía y controles de inmunofluorescencia positivos y negativos.

Las mejores células de referencia son células diploides del mismo individuo e igual tejido.

Para realizar una buena lectura de DNA se debe tener al CF en perfectas condiciones y ser cuidadoso en el proceso de preparación de la muestra y tinción. Es importante mencionar que el análisis e interpretación se debe realizar con el software adecuado.

Autofluorescencia: depende del tipo celular, de la longitud de onda del láser (disminuye al aumentar la longitud de onda), de la cantidad de ruido producido por el aparato con filtros ópticos y de la compensación.

Otras técnicas para aumentar la proporción señal/ruido:

Aumentar la frecuencia de las células deseadas en una población heterogénea, se puede conseguir purificando las células (lisis de los hematíes, centrifugación, eliminación de células muertas, etc.) antes de su procesamiento por citometría o bien con análisis multiparamétrico (empleando la dispersión frontal y lateral de luz) (25).

Cuantificación de DNA Celular

Los primeros estudios realizados en la década de los sesentas, en donde se evaluó la cantidad de DNA celular por citometría de flujo intentaron relacionarla con el diagnóstico del cáncer.

Otro hallazgo importante fue el hecho de que podía ser un buen indicador de eventos mutagénicos desarrollados por armas diseñadas en esa época. (26, 12, 29).

Moruzzi y colaboradores en 1979, dirigieron su atención al uso potencial del DNA como marcador para preseleccionar el sexo. En sus trabajos observaron una gran diferencia en cuanto al contenido de DNA entre los espermatozoides X y los Y de numerosas especies debido a la diferencia en la longitud de los cromosomas. Ellos reportaron una diferencia de DNA en un intervalo que va desde el 2.8 % en los humanos hasta el 7.5% en las chinchillas con un promedio general de varias especies del 6.6% (30). Utilizando únicamente la excitación de una lámpara de mercurio (no láser). Estos hallazgos fueron confirmados en 1988, por el grupo de investigación de Johnson, utilizando un citofluorómetro de alta resolución con un láser experimental con configuración ortogonal, que puede orientar a los espermatozoides, disminuyendo su movimiento al momento de pasar frente al láser facilitando su análisis (31, 32).

Los datos sobre las especies y la diferencia que presenta en el contenido de sus cromosomas sexuales se presenta en la Cuadro 2.

Cuadro 2

Especie	Diferencia entre cromosoma X y Y (%)
Ratón	3.2
Bovinos	3.6-4.0
Caballos	3.6
Conejos	3.0
Cerdos	3.6
Perros	3.9
Carneros	4.2
Chinchillas	7.5

Cuadro 2. Análisis comparativo de varias especies dependiendo de la diferencia en porcentaje de su contenido de DNA entre los espermatozoides que contiene el cromosoma X y los que contienen el cromosoma Y.

Los estudios realizados en la década de los setentas tuvieron la finalidad de modificar y hacer mas eficiente la utilización de la citometría de flujo como método de sexado, encontrando que el flujo del fluido del citofluorómetro podría cambiarse de cilíndrico a plano (20). Este cambio permitió una análisis más eficiente del contenido de DNA en los espermatozoides (33). Gledhill y colaboradores en 1976, reportaron que el uso del citómetro de flujo para medir el DNA de espermatozoides determinando los cambio que podía ocurrir a causa del daño genético, lo que resultan en problemas de fertilidad en el semen sexado. Las

forma asimétrica del espermatozoide así como su orientación al azar fue causa de fluorescencia diferencial, lo que enmascaró la diferencia en contenido de DNA entre los espermatozoides X y los Y (34, 35).

Con la finalidad de extender el uso de la citometría de flujo, como método de sexado espermático se han modificado dos aspectos tecnológicos, dando como resultado un enriquecimiento en la tecnología del sexado. Primero, la orientación de los espermatozoides en el camino del láser, y segundo el disminuir el diámetro de las boquillas, lo que reduce al máximo el espacio y por ende la movilidad de los espermatozoides (36). Esto permite notar hasta las más pequeñas diferencias en el contenido de DNA. Debido a la compactación de la cromatina espermática, la fluorescencia diferencial se presenta principalmente en el borde celular observado en la cara plana más transparente de la cabeza del espermatozoide. La adaptación de las boquillas orientadoras mejora su eficiencia de un 25% a una eficiencia del 75% al momento de analizar la cromatina (6, 5, 37, 38).

Una de las técnicas para el sexado espermático utiliza un colorante de DNA nuclear permeable a la membrana celular y no permanente, para la selección por citometría de flujo de espermatozoides X e Y, el Hoechst 33342. Este colorante se intercala entre los pares de bases del DNA ligándose principalmente a las regiones ricas en adenina-timina del DNA. Cuando el complejo es iluminado con luz ultravioleta este fluoresce y dicha fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA contenida en las células.

Con la finalidad de verificar la eficiencia del sexado con citometría de flujo, las colas de los espermatozoide son removidas por sonicación utilizando los núcleos liberados para un

segundo análisis de la cantidad de DNA presente en estos, por este método es posible observar las diferencias entre las poblaciones X e Y hasta de un 3.0% (7, 39).

Con algunos equipos de citometría actuales se pueden obtener rendimientos de 3×10^5 – 4×10^5 espermatozoides X o Y por hora como mínimo. Esta baja tasa de separación se debe a la necesidad de alcanzar una elevada pureza (máximo 90%) de las poblaciones espermáticas, sin embargo al aumentar la velocidad hasta $18 \times 10^6/h$ el grado de pureza de espermatozoides seleccionados puros se reduce al 75% (6).

La selección por citometría de flujo es una técnica de separación de espermatozoides que produce una alta purificación, sin embargo, este método requiere equipo costoso, a la vez que el número de espermatozoides seleccionados por hora es limitado (14).

Identificación del cromosoma y por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en la utilización de sondas o marcadores específicos que se unen a secuencias determinadas dentro de una proteína. En este caso se emplean sondas específicas para detectar la presencia del cromosoma Y dentro de la cromatina descondensada y amplificada de espermatozoides, se emplea como prueba de verificación del sexo subsecuente a un método de citometría de flujo para realizar el sexado. Los primeros marcadores para el cromosoma Y específicos de bovino fueron derivados de una secuencia denominada Y BRY, la cual se obtuvo tras la amplificación por medio de PCR del

cromosoma Y, del cual obtuvieron 469 pares de bases (40, 41). Los primeros autosomas derivados de la secuencia satélite de bovino dieron como resultado 246 pares de bases (41), los cuales se emplean como marcadores para indicar la presencia del cromosoma Y, los primeros estudios realizados fueron hechos para el sexado de embriones machos, utilizando en el PCR las fracciones específicas para cada sexo que se tenían aislados como marcadores (42).

Debido a que la información que arroja la técnica de PCR es cuantitativa se debe obtener a través del análisis de cien o más muestras con un mismo patrón de reacción (43). En ese caso, el porcentaje de espermatozoides X y espermatozoides Y puede ser calculado por la amplificación de 100 muestras de espermatozoides seleccionados con base en el contenido de cromosomas X o Y (7).

La expresión de los anticuerpos anti-H-Y es un método aplicable para el sexado de embriones de bovinos y estudios donde se han utilizado anticuerpos han reportado su uso para los embriones de bovinos machos y espermatozoides de toro (44). Los anticuerpos presentan una proporción similar (20 a 50%) de espermatozoides seleccionados X e Y entre los de cerdo y los de toro (45). En suma estos estudios muestran el reconocimiento de una proteína intracelular presente en todos los espermatozoides la cual solo se presenta en aquellas células que contiene el cromosoma Y (14, 45).

Método inmunológico del análisis de DNA

Un acercamiento interesante para el sexado de espermatozoide consistió en la demostración de la presencia de proteínas específicas del sexo de los espermatozoides (sex-specific proteins o SSPs), identificando diferencias en las proteínas presentes en los espermatozoides dependiendo de la presencia ya sea del cromosoma X o del Y. Para esto diseñaron un protocolo de purificación de proteínas específicas y posteriormente produjeron anticuerpos en contra de estas SSPs (SSAbs), para purificar los espermatozoides utilizando una columna cromatográfica de afinidad. Con esto, se propusieron sentar las bases para un proceso de sexado espermático por un método no invasivo, lo que preservaría la integridad del espermatozoide y su material genético (14, 42, 45).

Fluorocromos

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células (25, 46-49).

Las propiedades ideales de un fluorocromo son:

Alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz), Alto rendimiento cuántico (emisión de luz),

Elevada fotoestabilidad,

Corto estado de excitación.

Hay dos modos de uso: el primero es la unión covalente del fluorocromo a moléculas que se unen específicamente a componentes celulares, y el segundo es por medio de fluorocromos que varían sus características en función del microambiente que les rodea.

Al unirse el fluorocromo debe ser insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente. Es necesario tener presente que a longitudes de onda inferiores a 500 nm se produce una alta autofluorescencia celular debido a las flavinas.

Los fluorocromos de unión covalente: Son fluorocromos que reaccionan y se usan para marcar proteínas, lípidos, o cualquier otra molécula biológica. Deben ser suficientemente selectivos y reactivos. Ejemplo de ellos es el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, el rojo Texas, las cianinas y la ficoeritrina.

Los fluorocromos de unión no covalente: debido a su especial composición molecular se unen a determinados componentes celulares, fluorocromos específicos.

Ejemplo de éste tipo de fluorocromos se encuentran los siguientes:

- I. Marcadores del contenido en DNA y RNA: son específicos para el DNA o RNA, y dentro de ellos a determinadas bases. Entre los mas empleados se encuentra: el Hoechst 33342 (Unión a A-T, vital) que se excita con luz UV, intercalantes como el Bromuro de Etidio, Yoduro de Propidio se excita con un láser de 488 nm al igual que el Naranja de Acridina (39). Existen referencias con información contradictoria con respecto a los beneficios del Hoechst 33342; Libbus en 1987, plantea que al intercalarse entre las bases del DNA, causa algunas mutaciones, entre las pueden contarse las aberraciones en los espermatozoides de los mamíferos (50). En 1988,

Johnson y Clarke, plantean que los espermatozoides seleccionados son capaces de fertilizar indicando que la replicación del DNA es funcional aun unidos al colorante y bajo las condiciones de la citometría de flujo (6, 32, 51). Y para 1989 Johnson y colaboradores postulan que los fluorocromos reducen la viabilidad embrionaria y a la mitad las gestaciones (52). En tanto Fugger plantea que éste colorante no se intercala, no es citotóxico, y es un colorante reversible, el cual absorbe a 358 nm, se excita a 367 nm y emite a 461 nm (53).

Se ha desarrollado un fluorocromo con capacidades de tinción similares al Hoechst, denominado SYTO Green 13 el cual pertenece a la familia de los Syto, específicos para análisis de DNA y RNA, el cual penetra a la célula, es excitable por luz UV o visible, es usado para teñir células eucariontes vivas o muertas, así como en bacterias gram positivas y negativas, es permeable prácticamente a todas las membranas celulares, posee alta absorbancia molar, y una muy baja fluorescencia intrínseca, también puede ser utilizado para la detección de ácidos nucleicos en solución y en geles electroforéticos. Aunque no se puede comparar con el Hoechst, si puede ser una alternativa para su uso en la detección de ácidos nucleicos; en el presente trabajo será empleado con la finalidad de analizar el DNA de los espermatozoides, empleando la ventaja que presenta de mantener a los espermatozoides viables después de su análisis (54).

- II. Marcadores del potencial de membrana: como son las cianinas y la rodamina 123.
- III. Marcadores de membrana y lípidos, diferencian compartimentos con distinto pH: poco usados en citometría de flujo (47, 55, 56).

IV. De unión preferente a CG, entre estos se encuentran: la mitramicina, olivomicina, cromomicina A3.

Clasificación de acuerdo con su espectro de absorción.

- **Phenanthidium:** del tipo del Bromuro de Etidio y Yoduro de Propidio. Específicos para DNA y RNA (es necesario un tratamiento con RNAsa si sólo se desea medir DNA). Se excitan en el azul/verde-rojo, precisan de células muertas y fijadas, disminuyen la intensidad de su señal y especificidad la unión secundaria a los grupos fosfato, proteasas, DNA estructura Z y bromodeoxiuridina, no se afecta por el pH.

El IP se une al DNA de manera intercalada en células que tengan la membrana permeable, mostrando una fluorescencia roja. dicha característica la presentan los espermatozoides muertos.

- **Bisbenzimidaz:** tipo Hoechst, tienen elevada especificidad por el DNA y se unen a las bases A-T. Excitación en el ultravioleta-azul, tiñe células vivas, disminuye su intensidad con el pH ácido.
- **Cromomicina :** como la cromomicina A3, mitramicina, olivomicina. Se unen a las bases C-G del DNA. Se excita en el espectro ultravioleta-azul/verde. Requieren del ión magnesio (Mg) para la unión, pueden teñir células vivas. No afecta el pH.
- **Otros como:** Quinacrina (intercalante), Naranja de Acridina se une al DNA y RNA bicatenario.

El NA al evaluar la cantidad de cromatina condensada se intercala con el DNA, produce una fluorescencia verde cuando se une a ácidos nucleicos de doble hélice y fluorescencia roja

cuando se une a hebra sencilla. Por consiguiente la intensidad de la fluorescencia decrece cuando las proteínas están ligadas al DNA, ya que el acceso del colorante al DNA es menor (29).

Factores que influyen en la unión del fluorocromo al DNA:

1. Muestra a analizar: depende del DNA, de la composición de bases (AT, CG), de la presencia de bases modificadas (bromodeoxiuridina) o metilación, estructura del DNA. También depende de la unión entre las proteínas cromosómicas (histonas) y DNA, una unión fuerte entre ellos (formol) dificulta la incorporación del fluorocromo, se puede hacer incubación con proteasas. Hay que tener en cuenta la membrana citoplasmática (el IP no la atraviesa), y componentes intracelulares.
2. Química, cinética y equilibrio de la unión: depende la concentración de sales del medio (favorece la disociación histona-DNA), fuerza iónica (inhibe unión secundaria), la cromomicina necesita Mg^{+2} , el pH (el pH ácido favorece la unión secundaria del Hoescht). Se debe tener cuidado con la concentración, las condiciones y el tiempo de incubación

En la Cuadro 3 se muestran los fluorocromos empleados en el presente estudio y su rango de absorción y emisión.

Cuadro 3

Compuesto	Absorción (max)	Emisión (max)
IP	536	623 (617)
NA	480 (503)	520 (530)
SYTO Green	504	523

Cuadro 3. Fluorocromos empleados para el análisis de DNA, presentando las longitudes de onda a las que absorben y emiten fluorescencia. Datos de Molecular Probes (<http://www.probes.com>)

Historia del sexado espermático.

En 1910 se descubrió el cromosoma sexual citado por Seidel (1). Uno de los primeros experimentos que se realizaron con éxito sobre el sexado espermático haciendo referencia al contenido de DNA fue realizado por Lush, en 1925 (57). Los primeros resultados sobre el sexado espermático basado en las diferentes concentraciones de DNA se presentaron en el simposio que realizó la Universidad de Pensylvania en 1970.

En la década de los setentas se plantearon algunos métodos como la centrifugación, la sedimentación, las columnas de albúmina, las superficies antigénicas, para la separación de espermatozoides en poblaciones de espermatozoides X y espermatozoides Y citado por Welch en 1999 (7).

Los métodos modernos para el sexado de espermatozoides pueden clasificarse en dos grupos: Aquellos que intentan separar espermatozoides de acuerdo con sus características físicas o cinéticas (dichas técnicas comprenden: el fraccionamiento sobre columnas de

albúmina, filtración en Sephadex, separación electroforética y varios tipos de fraccionamiento de flujo, y las técnicas que se basan en las diferencias nucleares de los espermatozoides que contienen el cromosoma X o el Y. Este último procedimiento ha permitido la obtención de poblaciones altamente purificadas de espermatozoides X o Y, seleccionados de acuerdo con su contenido de DNA.

El sexado espermático por citometría de flujo

El método empleado por Maxwell y colaboradores en 1999, indica que el sexado espermático por citometría de flujo requiere de dos etapas para el semen en dilución. En la primer etapa se diluye la muestra de semen de 100 a 200 veces en el caso de los verracos y toros, y de 500 a 1000 veces en caso de carneros. La primer etapa transcurre desde el momento en que el semen sin ningún tratamiento se va a sumergir en la preparación que contiene Hoechst 33342 un fluorocromo que se une al DNA de forma no permanente y que es requerido para la diferenciación de los cromosomas X e Y. La segunda etapa ocurre después de pasar la muestra por el citómetro de flujo para seleccionar las células y termina cuando los espermatozoides seleccionados son proyectados a un tubo que contiene un fluido colector. Maxwell y colaboradores, demostraron que el plasma seminal puede mejorar la viabilidad del espermatozoide de carneros y cerdos y toros altamente diluidos, preparados para la selección en el citómetro de flujo (58, 59).

La técnica que emplea Johnson, demostró que la presencia de distintas cargas entre los espermatozoides dentro del tubo de colecta provocan la aglutinación de las cabezas de los espermatozoides. Este problema se reduce al adicionar plasma seminal el cual contiene proteínas que evitan la agregación, una de ellas es la albúmina sérica bovina, esta última puede adicionarse purificada (5).

El sistema de sexado por citometría no está libre de problemas, en su mayoría son de tipo técnico. En la actualidad existe una metodología denominada Beltsville Sperm Sexing Technology (BSST), de la cual han nacido más de 400 animales. La citometría de flujo aún es impracticable en los sistemas tradicionales de inseminación artificial (IA) debido al escaso número de espermatozoides que pueden ser separados (5, 60).

Para el sexado espermático por citometría de flujo se ha establecido que son importantes diversos factores entre los que, Maxwell y colaboradores demostraron que el plasma seminal puede mejorar la viabilidad de los espermatozoides de carnero, cerdo y toro altamente diluidos, preparados para su selección por medio de esta metodología (61). También se ha observado que el proceso de preselección del semen influye en la eficiencia de la separación en el citómetro de flujo, su objetivo es remover la mayoría de los espermatozoides muertos, inmóviles y anormales, así como contaminantes de las muestras (6). Se ha realizado la selección de espermatozoides por medio de citometría de flujo, siendo confirmado después por un segundo análisis de DNA basado en la FISH con buenos resultados (62, 63).

Hipótesis

Se sabe que las poblaciones de espermatozoides X tienen mayor cantidad de material genético en comparación con el que contienen los espermatozoides Y, por lo tanto si se tiñe el material genético y se obtiene la fluorescencia diferencial de dichas poblaciones estos se podrían separar mediante el uso de la citometría de flujo, para utilizar los espermatozoides del sexo deseado en diversos estudios.

OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar mediante citometría de flujo un estudio comparativo del contenido de DNA de espermatozoides en dos especies (bovinos y cerdos), utilizando tres fluorocromos (Yoduro de Propidio, Naranja de Acridina y SYTO Green), y determinar en muestras libres de colorante si la diferencia en contenido de DNA es suficiente para que el tamaño de la cabeza espermática se modifique para así separar a los espermatozoides X de los Y.

Objetivos Específicos

Localizar las regiones correspondientes a los espermatozoides en el citómetro de flujo tratando de aislar en dos zonas a los espermatozoides agrupados en poblaciones de espermatozoides con el cromosoma X o el cromosoma Y, de acuerdo a su diferencia en tamaño de la cabeza.

Estandarizar la técnica de tinción de DNA con IP y con NA en poblaciones de espermatozoides de bovino y cerdos.

Estandarizar la técnica de marcaje de DNA de espermatozoides de bovino y cerdo con el colorante vital Syto Green.

Determinar mediante la técnica de PCR o FISH el grado de pureza de las poblaciones seleccionadas.

MATERIAL Y METODOS

Lugar

El trabajo fue realizado en los laboratorios de Biología Celular , Departamento Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Fechas

El trabajo fue realizado entre octubre del 2000 y octubre del 2001.

Equipo

Citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson).	5-40 μ l, 40-200 μ l, 200-1000 μ l y 1-5 ml.
Microscopio óptico	Tubos de plástico de 50 ml y 15 ml
Centrífuga	Tubos para citometría de 5 ml
Báscula	Tubos Eppendorf de 2 ml
Potenciómetro	Puntas amarillas, azules, blancas, transparentes (500 μ l, 1 ml y 50 μ l, 5 ml respectivamente)
Vortex	
Centrifuga Eppendorf 5415	Porta y cubre objetos de cristal
Bomba de vacío	Vasos de precipitado de 50 ml y 4 lts.
Embudo de filtración de cristal	Membranas de filtración con poros de
Material de laboratorio	022 μ m
Micropipetas de 0.2-2 μ l, 0.5-10 μ l,	

Material biológico

- Pajillas congeladas con una capacidad de 0.5 ml de semen de toros de calidad probada de las razas: Holstein y Cebú
- Dosis de 20 ml de semen fresco, puro, de cerdo de calidad probada de las razas: Duroc, Hampshire, Landrace y Pietrain

Medios, Sustancias y Fluorocromos

- | | |
|--|--|
| • Albúmina Sérica Bovina Fracción V(BSA) | • Bromuro de Etidio |
| • EDTA | • Solución Buffer FACSFlow |
| • Solución Buffer de Fosfatos (PBS) | • NaCl |
| • Solución amortiguadora (TNE) | • Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O |
| • Etanol grado reactivo | • KH ₂ PO ₄ |
| • Yoduro de Propidio | • TRIS |
| • Naranja de Acridina | • Kit de calibración CALIBRITE Beads |
| • Syto Green (Molecular Probes No. de catálogo S-7575) | • Kit de calibración para DNA (DNA QC particles) |
| • Hipoclorito de sodio al 10% | • Heparina |
| • Agua desionizada | • Medio McCoy |
| • Agarosa al 3%, | • Linfograd |

Los resultados obtenidos tras la adquisición de las muestras en el CF, se registraron en una computadora Power Macintosh, para la recolección y análisis. Para la colección de datos se utilizó el programa "CellQuest" y para su análisis el programa "Modfit LT", específico para análisis de DNA. El análisis estadístico fue realizado por medio del programa llamado Statistical Analysis System (S.A.S.)

METODOLOGÍA

Preparación de reactivos y soluciones

Antes de la utilización de las muestras de semen fue necesario contar con todos los reactivos, soluciones y amortiguadores necesarios para procesar las muestras.

Preparación de la Solución Buffer de Fosfatos de Dulbecco (PBS)

Disolver las siguientes sales en agua desionizada en la proporción y orden siguiente (g por cada 1000ml)

NaCl	8.00
KCl	0.20
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	1.15
KH ₂ PO ₄	0.2

Incorporar al agua en el orden en que se presentan y esperar a que se disuelva cada una de las sales antes de incorporar la siguiente, todo esto en agitación constante, verificar el pH que se debe encontrar en 7.4 antes de aforar la solución, filtrar con una membrana de

0.045mm. Lo solución preparada mantenerla en refrigeración hasta el momento en que se utilice.

Preparación del amortiguador TNE

Disolver las siguientes sales en agua desionizada en la siguiente proporción (g por cada 1000ml).

TRIS	1.2114 gr
NaCl	8.766 gr
EDTA	0.2922 gr.

Las sales se van incorporando al agua en el orden en que se presentan y esperando que se diluyan cada una de ellas antes de incorporar la siguiente, todo esto en agitación constante, verificar el pH se encuentre en 7.4, aforar al volumen requerido, filtra con una membrana de $0.22\mu\text{m}$, mantener a temperatura ambiente hasta el momento en que se utilice.

Preparación de Albúmina Sérica Bovina fracción V (BSA).

Prepara a una concentración del 10% en agua desionizada, disolver en agitación muy lenta con la finalidad de no desnaturalizar la albúmina y que no formar espuma, filtrar con una membrana de $0.20\mu\text{m}$.

Mantener en congelación o refrigeración antes de ser utilizada en el recubrimiento de los tubos que recolectaran la muestra separada por el citómetro.

Preparación de fluorocromos

Preparación del IP

El IP se encuentra en polvo y es necesario prepararlo en el buffer TNE, medio final en el que se trabajarán las muestras.

Preparar una solución stock de 50 μg por ml, pesar, diluir y conservar en oscuridad hasta el momento de utilizarlo para que no pierda su fluorescencia.

El volumen final empleado será 5 μg de IP por 1 ml de muestra.

Preparación del NA

La NA se encuentra en polvo y al igual que el IP se prepara en TNE para obtener una solución stock de 1 mg por 1 ml, la NA se pesa, diluye y conserva en la oscuridad y en refrigeración hasta el momento de ser utilizada.

El volumen final a utilizar por muestra es de 6 μg de NA por 1 ml de muestra.

Preparación del SG

El SG no requiere preparación pues su presentación es líquida y se adiciona directamente 0.2 μl a las muestras que se procesaran con este fluorocromo.

Calibración del FACSCALIBUR de Becton-Dickinson (BD)

Con la finalidad de montar la técnica de análisis de DNA en espermatozoides de cerdo y bovino se procedió a calibrar el citómetro de flujo para lo cual se utilizaron perlas de

calibración Becton Dickinson para observar la disposición de las células de acuerdo a la fluorescencia que emiten al encontrarse unidas a un colorante.

Calibración con perlas

El proceso comienza con la preparación de las perlas en dos tubos de citometría los cuales deben contener lo siguiente

Tubo A: perlas sin marcar

Tubo B: perlas sin marcar frasco gris

Perlas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), frasco verde

Perlas con Ficoeritrina (PE), frasco naranja

Perlas con peridinin chlorophyll protein (PerCP), frasco rojo

De cada frasco se toma una gota que corresponde a 20 μ l, cantidad que debe ser diluida en 1 ml de medio de flujo (FACSFlow BD).

La calibración consiste en que el citómetro acomode las perlas de acuerdo al tamaño y granulosis de las mismas, con la finalidad de localizarlas en distintas regiones de acuerdo a las siguientes características: 1) tamaño y granulosis de las células y 2) De acuerdo al grado de fluorescencia. Lo cual se realiza con el tubo A.

Las perlas sin colorante son útiles para determinar la autofluorescencia, la cual se debe localizar en el extremo izquierdo de la gráfica presentada por el equipo.

Cuando se ha calibrado con las perlas del tubo A, se procede a compensar el equipo con la finalidad de que al momento de analizar las muestras éste discrimine cada una de las fluorescencias contenidas en la mezcla del tubo B

Los colorantes deben de situarse en los dos cuadrantes superiores e inferior derecho en mas de un 90% para que lo descartado por el CM no sea la autofluorescencia.

Después se evalúa la sensibilidad la cual le permite al equipo poder diferenciar entre las señales producidas por sonidos propios del equipo de aquellas señales emitidas por las perlas. Dicha señal puede ser amplificada en forma lineal (LIN) utilizada para la fluorescencia y la logarítmica (LOG) que detecta la forma y la granulosisidad.

Los programas (software) que se utilizaron fueron:

- **FACScomp** Para la compensación y calibración del equipo
- **CellQuest** Para adquirir y analizar las muestras y
- **ModFit LT** Para realizar el análisis de DNA

Antes de iniciar el trabajo de adquisición de muestras es necesario purgar el sistema para eliminar la presencia de burbujas de aire en las mangueras del sistema.

Ya calibrado de procedió a probar el equipo con células sanguíneas.

Procesamiento de muestras sanguíneas.

1. Heparinizar una jeringa de 3 ml
2. Obtener la muestra en dicho tubo
3. Diluir la sangre 1:1 en medio McCoy
4. Recubrir un tubo con linfograd
5. Colocar suavemente la muestra en el tubo tratando de que resbale por las paredes
 - Centrifugar a 3000rpm, 20 minutos a 10° C
6. Obtener las diferentes fases en el tubo
 - En el fondo del tubo se encuentra un botón formado por el linfograd
 - En la parte media se encuentra una capa blanca de linfocitos y monocitos y
 - En la superficie se encuentra el medio McCoy.
 - Se colecta la porción blanca para realizar el análisis separación y recuperación de las muestras.
7. La banda blanca se coloca en 2 ml de medio McCoy
 - se centrifuga a 1200 rpm 5 minutos y 10° C
 - se elimina el sobrenadante
 - se adicionan 2 ml de PBS con BSA

- se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos a 10° C
- se elimina el sobrenadante
- se resuspende en 1 ml de PBS con BSA

8. Se procede a realizar el separación y recuperación celular.

Después de la separación de las células sanguíneas se procedió a separar las muestras con espermatozoides, y lo primero que se hizo fue calibrar el citómetro para el análisis del contenido de DNA.

Calibración para el análisis de DNA

Se emplea un KIT especial para DNA, el cual esta conformado por dos frascos que contienen:

1.- Núcleos de eritrocitos de pollo (CEN), que son células en G0 que se aglomeran con la finalidad de reconocer las regiones donde se presentan los dobletes (células que presentan una cantidad de DNA diplode) y

2.- Timocitos de ternera (CTN) con células en fase G0/G1, S, G2/M

El citómetro cuenta con un programa específico de la calibración para DNA, al abrir el programa hay que verificar que los detectores estén activados para detectar los dobletes.

Antes de iniciar la adquisición de las muestras es necesario indicar el número de eventos que se desean, el cual no debe ser menos a 20000 eventos, además de indicar que la adquisición debe ser realizada a velocidad baja (low), para obtener mejores resultados.

Primero se calibra con CEN y la población de $2n$ debe aparecer en el canal de fluorescencia 200, por tanto $4n$ debe estar en el canal 400, esto se logra modificando el voltaje de FL2, canal donde se observa la fluorescencia del IP, fluorocromo empleado para teñir las perlas de calibración y también las muestras a trabajar.

Después de calibrado el citómetro se procedió a adquirir las muestras de espermatozoides con la finalidad de localizar la región donde se localizan los espermatozoides y de esta forma proceder a la separación y recuperación de los espermatozoides, los cuales se colectan en tubos de 50 ml recubiertos de BSA al 10%.

Para poder corroborar la separación y recuperación celular, el volumen recuperado es reducirlo para concentrar los espermatozoides por medio de centrifugación, cuando se obtiene un botón de espermatozoides se observaron por medio de citometría para verificar que se encuentren en la misma región de donde fueron adquiridos y otra parte se observó directamente en un microscopio.

Obtención de la muestra de semen de toro y cerdo.

El trabajo experimental constó de un total de 60 muestras, repartidas de la siguiente manera: 30 muestras de cerdo y 30 de toro, de las cuales 10 se tiñeron con IP, 10 con NA y 10 mas con SG.

Las muestras de toro fueron proporcionadas de la empresa ULTIMATE GENETICS, de FRANKLIN, TEXAS la cual donó las pajillas de semen congelado de dos sementales, de las raza Cebú y Holstein, para el presente estudio.

Las muestras de cerdo fueron compradas a un centro de Inseminación localizado en la Delegación Tláhuac. Estas correspondieron a semen fresco colectado el mismo día de su utilización provenientes de ocho cerdos de cuatro razas diferentes.

Procesamiento de las muestras

Las muestras se manejaron por separado tanto por la fuente como por la presentación (semen congelado y semen fresco)

Procesamiento de las pajillas de Toro

Para la utilización de las muestras de toro se procedió a descongelar las pajillas a baño maría a una temperatura de 35°C por 30 segundos, descongeladas las muestras se procedió a resuspender el contenido de las mismas (de 4 a 5 x 10⁶ espermatozoides en 500µl) en 1 ml

de PBS para de ahí tomar una gota de 20 μl y analizar la morfología, movilidad y porcentaje de viabilidad de los espermatozoides contenidos en cada una de las muestras.

Posteriormente se lavaron las muestras para eliminar el medio de criopreservación y teñir a los espermatozoides.

Procesamiento de las muestras de semen fresco de Cerdo

Las muestras de cerdo fueron analizadas a su llegada al laboratorio, comprobando la movilidad, morfología y concentración de las muestras, para lo cual se realiza una dilución del semen completo, Para realizar el conteo de espermatozoides y determinar la concentración de la muestra se llevó a cabo el protocolo siguiente :

1. Se toman 10 μl de semen por 990 μl de diluyente para obtener una solución 1:100
2. Se resuspende y se procede a tomar una gota de 10 μl de dicha suspensión para colocarla en la cámara de Neubauer (10 μl en cada cámara)
3. Se procede a realizar el conteo de los cuatro cuadrantes con sus 16 cuadros respectivamente
4. Se realiza una sumatoria de los 4 valores y se procede de la misma forma con la segunda cámara
5. Se suman ambos valores y se dividen entre cuatro

6. El resultado se eleva primero al exponente de la dilución y después al de la cámara, que es de 10^4 .

NOTA: no es conveniente tomar menos de 5 μ l de la suspensión que va a ser contada por que el resultado no será representativo.

Posteriormente se procede a realizar la dilución adecuada para tener una concentración de 5×10^6 espermatozoides en un volumen final de 1 ml, el cual ya puede ser lavado de la misma forma que las muestras de toro.

En el caso de las muestras de semen fresco de cerdo, como se encuentran en estado líquido se procedió directamente al lavado de las mismas con la finalidad de eliminar el plasma seminal, debido a que se reporta que dicho líquido interfiere con el proceso de tinción y análisis del contenido de DNA por medio de CF.

Lavado de las muestras

Se colocaron las muestras en tubos de centrifuga con capacidad de 15 ml.

Se adicionó un volumen de 5 ml de TNE homogeneizando las muestra suavemente,

Se colocaron las muestras en la centrifuga y se sometieron a un ciclo de 10 minutos a una velocidad de 250g,

Se eliminó el sobrenadante y el botón celular resultante se resuspendió nuevamente en 5 ml de TNE Repetir por dos ocasiones más los ciclos de centrifugación, y al final de dicho proceso se resuspendió el botón en 1 ml de TNE.

Realizado el lavado se siguieron tres caminos distintos:

1) Analizar las muestras directamente en el CF sin la adición de ningún colorante: para lo cual se dejó la muestra de espermatozoides en un volumen final de 1ml y se colocó directamente en el CF para su lectura y análisis.

2) Se utilizaron los colorantes IP y NA, los cuales requieren de membranas permeables para que puedan penetrar y unirse al DNA. Para lo cual, las muestras fueron sometidas a un choque térmico, que consiste en someterlas a temperatura de congelación por 90 minutos. Transcurrido ese tiempo se colocaron a baño maría a 45°C por 20 minutos, se resuspende y se centrifuga a 250g X 10 minutos, se elimina el sobrenadante y el botón celular se resuspende en 1 ml de PBS para teñir con IP; en caso del NA en TNE. Dicha técnica aplica en ambos casos, tanto para la utilización de las muestras de semen de toro como de cerdo.

Con la finalidad de conservar la integridad de las membranas nucleares y que no se degraden los espermatozoides se procede a fijar las muestras de la siguiente manera:

Se colocaron las muestras en tubos de 15 ml y en el vortex se agitaron con la finalidad de que se encuentre la muestra en constante movimiento y evitar que los espermatozoides se peguen y formen grumos que después no podrían ser separados imposibilitando la utilización de dicha muestra para el proceso de tinción. Mientras se agita la muestra se adicionan 3 ml de una solución de etanol grado reactivo (previamente refrigerado a -4°C por un lapso no menor de 24 horas) para obtener una muestra final al 75% de etanol. Lograda la incorporación del etanol a la muestra de espermatozoides se dejaron reposar en refrigeración un periodo de 2 horas para que se fijaran las muestras. Transcurrido dicho tiempo se sacaron

las muestras de refrigeración y se volvieron a lavar por centrifugación, un ciclo a 250g por 10 minutos para eliminar el etanol, el botón resultante se resuspendió nuevamente en 1 ml de TNE y se procedió a teñir las muestras, unas con IP y otras con NA.

3) Las muestras de semen con espermatozoides vivos, se tiñeron con Syto Green, con la finalidad de probarlo, para esto, las muestras después de ser lavadas y resuspendidas en TNE se tiñeron y se analizaron.

Técnicas de tinción

Tinción con IP

Las muestras fueron colocadas en tubos de citometría con una capacidad de 5 ml, en los cuales se adicionó un volumen de IP 50 μ l a una concentración de 50 mM, se procedió a homogeneizar suavemente la muestra y se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 minutos.

Tinción con NA

Las muestras fueron colocadas en tubos de citometría con una capacidad de 5 ml, en los cuales se adiciona un volumen de NA 1.2 μ l, a una concentración de 5 mM se procedió a homogeneizar suavemente la muestra y se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 minutos.

Tinción con SG

Las muestras fueron colocadas en tubos de citometría con una capacidad de 5 ml, en los cuales se adiciona un volumen de 0.2 μ l a una concentración de 10 mM, se procedió a homogeneizar suavemente la muestra y se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 minutos

Una vez realizada la tinción se procedió a analizarlas en el CF.

RESULTADOS

Calibración del citofluorómetro.

La evaluación de muestras de sangre de humano permitió observar que el citofluorómetro trabaja correctamente por la identificación de las regiones de los leucocitos totales que son ampliamente conocidas. En la figura 3a, se observan las regiones correspondientes a los leucocitos, granulocitos y monocitos. En Figura 3b se muestra la región en donde se encuentran los linfocitos aislados por medio de gradiente de Linfograd.

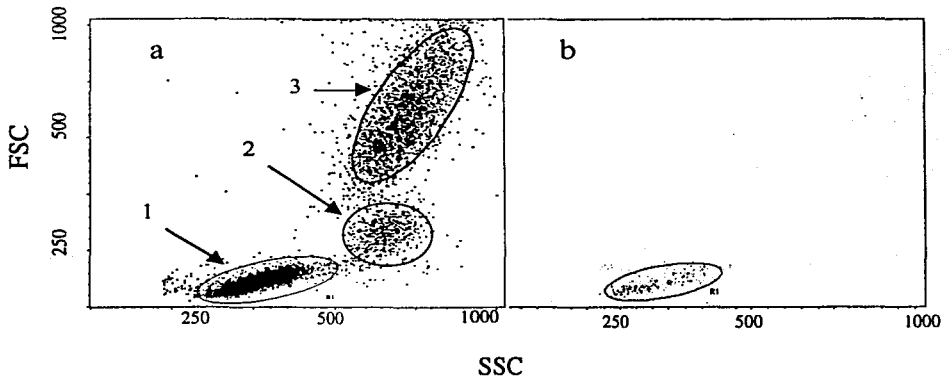


Figura 3a. Gráfica de puntos de sangre completa, se observa marcado con el 1 la región de los linfocitos, con el 2 a los granulocitos y con el 3 a los monocitos. 3b. Gráfica de puntos donde se muestran linfocitos aislados por medio de un gradiente de Linfograd.

Estandarización para la cuantificación del DNA en citometría de flujo

Los datos que ofrece el CF, al momento de adquirir muestras, pueden variar dependiendo de la tinción, la preparación de la muestra y la calidad del citómetro.

La calibración para el análisis de DNA se realiza mediante la asignación de valores de fluorescencia utilizando estándares. Esta es determinada, midiendo el coeficiente de variación de la distribución del pico de células en fase G0/G1 a partir de un estándar que son los núcleos de eritrocitos de pollo (CEN), minimizando las variaciones debidas a artefactos al momento de la preparación de las muestras, lo que es un factor crucial para optimizar las condiciones en el análisis de DNA. Los núcleos de eritrocitos de pollo fijados con etanol, al momento de ser analizados por CF, muestra núcleos aislados (simples), dobles o pegador en pares (dobletes), núcleos unidos de tres en tres (tripletes) y agregados mayores. Cuando los CEN se tiñen con IP, forman cuatro o más picos, al analizarlos utilizando el parámetro FL2-A, la respuesta del instrumento es lineal, e indica que la tinción fue realizada correctamente, estos picos deben ser 2, 3 y 4 veces más grandes que el canal de las muestras de núcleos solos o simples (Figura 4a, b). El mismo procedimiento se sigue con núcleos de timocitos de ternera (CTN) de los cuales se muestra un histograma donde se muestran los picos en los canales de fluorescencia adecuados para los núcleos solos, dobles, etc., el uso de éste tipo de núcleos es bueno debido a se manejaron muestras de toro (Figura 4c). Para que la calibración se encuentre correcta, las mediciones el coeficiente de variación (CV) del pico M1 debe ser de 1.85 y la linealidad de 1.995.

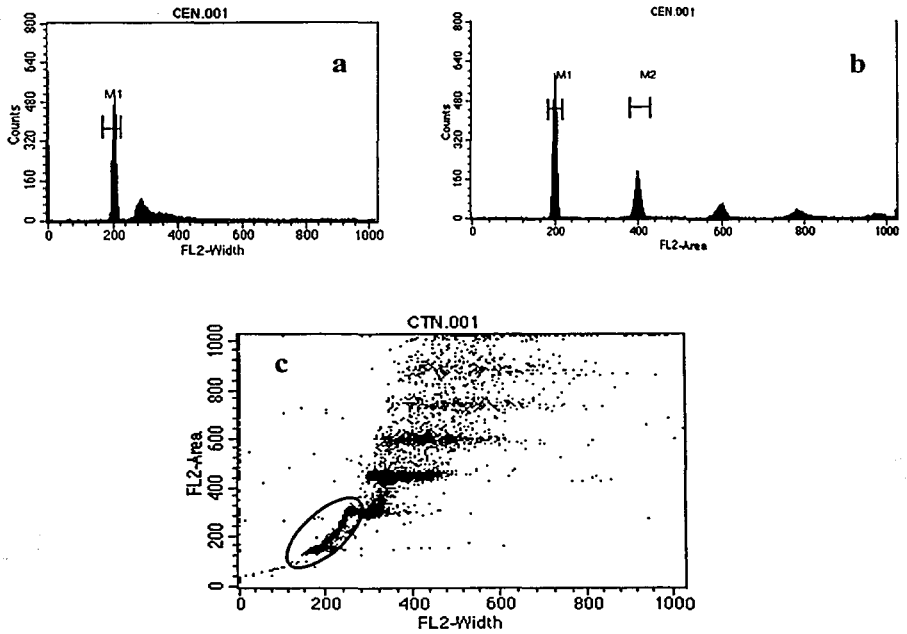


Figura 4 Gráficas de CEN teñidos con IP. 4a. Se graficó el ancho de la fluorescencia 2 (FL2W) contra el número de los eventos, con esta gráfica se modifica la ganancia en el amperaje hasta obtener un valor de 200 ± 5 . 4b. Histograma del área de la fluorescencia 2 (FL2-A) con el que se ajusta el voltaje hasta obtener un valor de 200 ± 5 , para luego obtener el coeficiente de variación y la linealidad de la medida. 4c. Gráfica de puntos donde se muestran núcleos de timocitos de ternera (CTN) de FL2-W vs FL2-A en dónde se determina la región en el cual se cuantificaron los núcleos solos.

Determinación de la zona de localización de los espermatozoides toro y cerdo.

Tratando de encontrar la forma en que se lograra una mejor separación de las dos poblaciones de espermatozoides, las muestras fueron analizadas con los parámetros en dos tipos de escala conocida y manejada por el CF: una escalas logarítmicas (Log.) Figura 5a y una escala lineal (Lin.) Figura 5b, lo cual permite observar las muestras con una mejor dispersión celular, lo que favoreció la localización de los espermatozoides, para las pruebas que se realizaron.

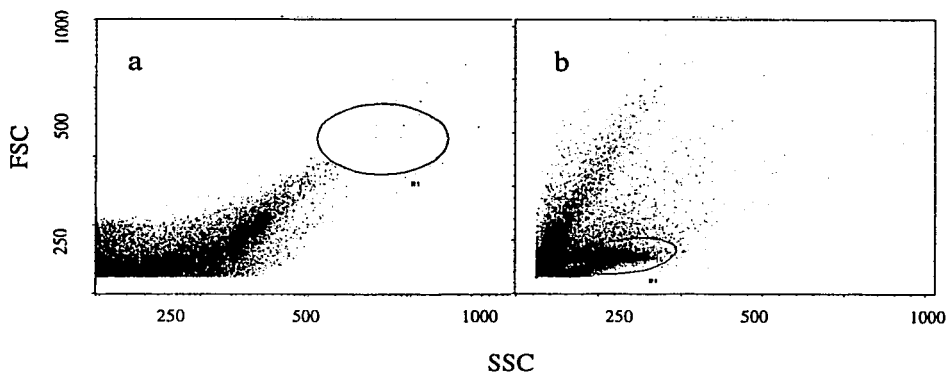


Figura 5a. Muestra de espermatozoides de cerdo adquiridos con la finalidad de analizar los parámetros FFC y SSC en forma logarítmica, separando en una región correspondiente a la población de los espermatozoides encerrada en una elipse. 5b. Gráfica de puntos de espermatozoides adquiridos en forma lineal es posible observar una población mayor a comparación con lo que se observa en la adquisición de la muestra en forma log.

La adquisición con escala logarítmica fue reportada para identificar a los espermatozoides humanos. Sin embargo, como se observa en la Figura 5a, la población aparece muy dispersa. Al adquirir la muestra con parámetros lineales (Figura 5b) se logra observar una mejor dispersión de la misma población de espermatozoides y un mayor número de eventos en la región seleccionada. Lo que facilitó una mejor localización de la región donde se encuentran los espermatozoides

Una vez identificada la región de los espermatozoides de cerdo se realizó el mismo procedimiento de adquisición con las muestras de toro, obteniendo una distribución similar a la que presentan los espermatozoides de cerdo. Las muestras de semen de toro analizadas con escalas logarítmicas, se muestran en la Figura 6a y con escalas lineales en la Figura 6b.

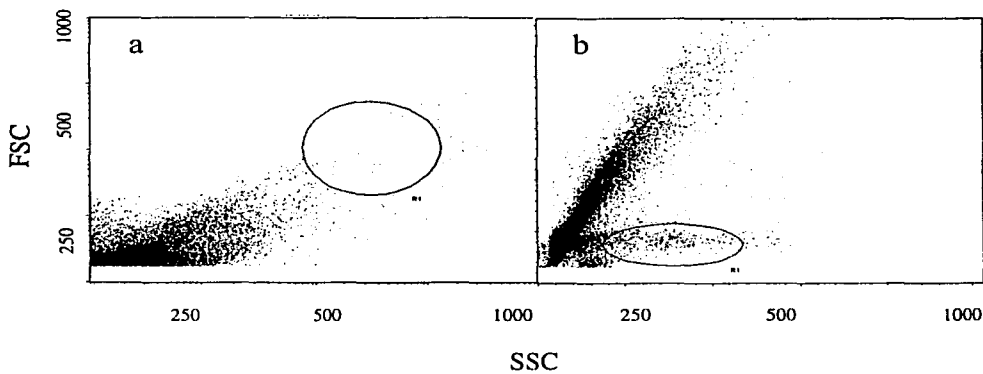


Figura 6a Muestra la distribución de los espermatozoides de toro adquiridos con parámetros logarítmicos, en la que es posible determinar a la región correspondiente a los

espermatozoides delimitada por el elipse. Figura 3b Gráfica de puntos con parámetros lineales donde es posible observar una región más clara de espermatozoides.

Los experimentos descritos anteriormente, tuvieron la finalidad de identificar a los espermatozoides con cromosoma X o Y solamente por su tamaño. Esto último no fue posible debido a que la diferencia en el tamaño de las cabezas de los espermatozoides tanto de cerdo como de toro no fueron suficientes para separarlos en dos poblaciones. Sin embargo los datos proporcionados por estos experimentos, fueron de gran importancia para la ubicación de la región donde se localizan los espermatozoides.

Determinación del contenido de DNA de espermatozoides bovinos y porcinos mediante fluorocromos específicos para DNA.

Una vez localizada la región en que aparecen los espermatozoides tanto de cerdo como de toro se procedió a realizar el proceso de adquisición de las muestras tiñéndolas con diversos colorantes específicos para DNA.

Los resultados del total de las muestras se encuentran en el anexo I al final del trabajo, donde se muestra un análisis completo realizado por medio de un programa estadístico S.A.S., donde se procesaron los datos obtenidos del CF y que de forma gráfica muestra la composición de los promedios las muestras analizadas, por especie y colorante, además de mostrar un ejemplo de las muestras más representativas de cada grupo.

Muestras teñidas con IP

Para el análisis de las muestras se desplegaron dos ventanas donde se observaron dos gráficas de puntos, una ventana mostrando los parámetros de tamaño (FSC) y granulosidad (SSC) Figura 7a. muestra una gráfica donde se delimitó la región correspondiente a los espermatozoides. En la Figura 7b se muestra una gráfica de puntos, con las variables ancho (FL2-W) contra el área de la fluorescencia de IP (FL2-A), estas gráficas se utilizaron para descartar a los espermatozoides que formaban agregados.

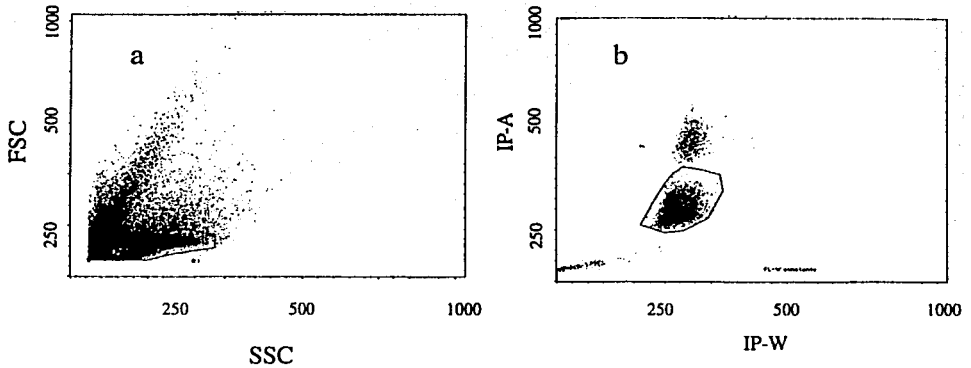


Figura 7a Adquisición de espermatozoides de cerdo en forma lineal. Se observa la dispersión de igual manera que en la adquisición sin colorante, seleccionando la región encerrada en un elipse donde se localizan los espermatozoides, la cual sirvió para localizarla en el gráfico del ancho (W) y área (A) de fluorescencia. **7b** Se observa un grupo más homogéneo y localizable. En el cual es posible notar dos subpoblaciones que en teoría corresponden a las dos subpoblaciones de espermatozoides que contienen el cromosoma X o al cromosoma Y,

En los histogramas obtenidos de las gráficas de puntos anteriores, es posible observar un desplazamiento hacia la derecha y el segundo hacia la izquierda, esto cumpliendo con el entendido de que los espermatozoides que contienen el cromosoma X contienen más DNA y por tanto fluorescen más que los que contienen el cromosoma Y, lo cual se puede interpretar como que los que contienen en X están desplazados hacia la derecha y los que contienen al Y se localizan hacia la izquierda

Utilizando únicamente los espermatozoides presentes en la región delimitada en las gráficas de puntos anteriores, se muestran los siguientes histogramas de frecuencia confrontando en el eje de las ordenadas el conteo celular y en el eje de las abscisas los valores de fluorescencia IP-H (FL2) Figura 8a y el ancho (FL2-W) en la Figura 8b.

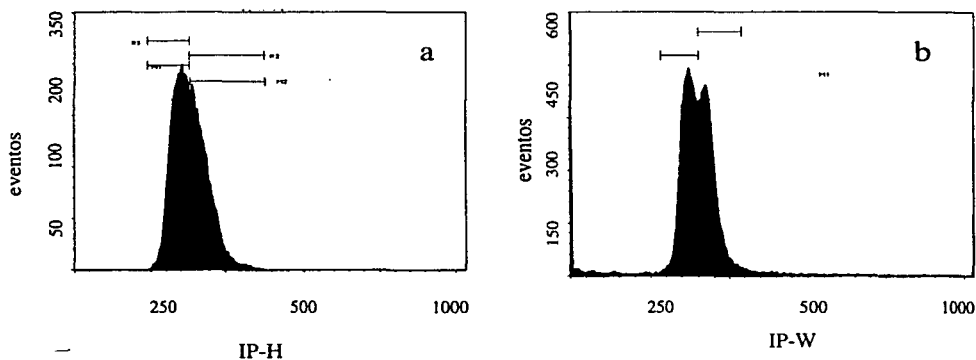


Figura 8a. En el histograma se muestra la fluorescencia de la población de espermatozoides de la región seleccionada en la gráfica de puntos, en el cual no es posible observar las dos subpoblaciones de espermatozoides bien delimitadas. 8b. Histograma que muestra el ancho de la fluorescencia debida al IP, es posible observar dos picos que podrían corresponder a dos poblaciones.

Muestra de toro teñidas con IP.

Se realizó el mismo análisis con las muestras de espermatozoides de toro y así aparece en las gráficas de puntos que corresponden a las figuras 9a, 9b, y los histogramas correspondientes a esos mismas regiones se observan en las Figuras 10a y 10b.

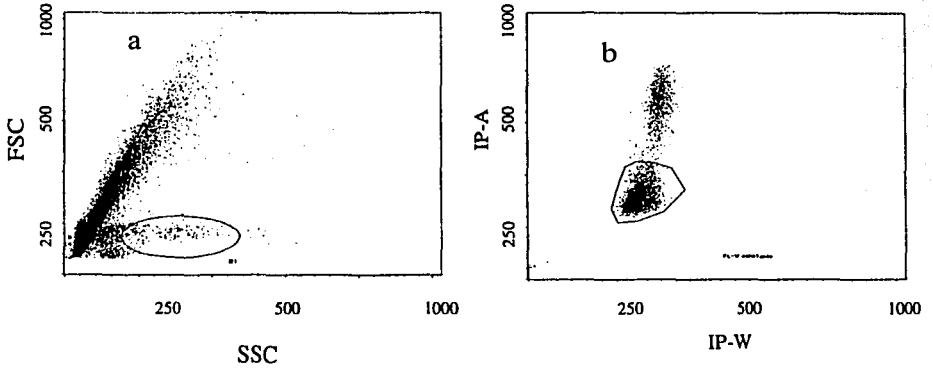


Figura 9a, Gráfica de puntos donde se muestra la disposición de la población analizada de acuerdo a su tamaño y granulosidad (FSC vs SSC). **9b** Gráfica en la que se muestra la disposición de la población espermática de acuerdo al ancho y al área de la fluorescencia emitida (IP-W vs IP-A respectivamente) por el material genético de los espermatozoides de toro empleados para este análisis.

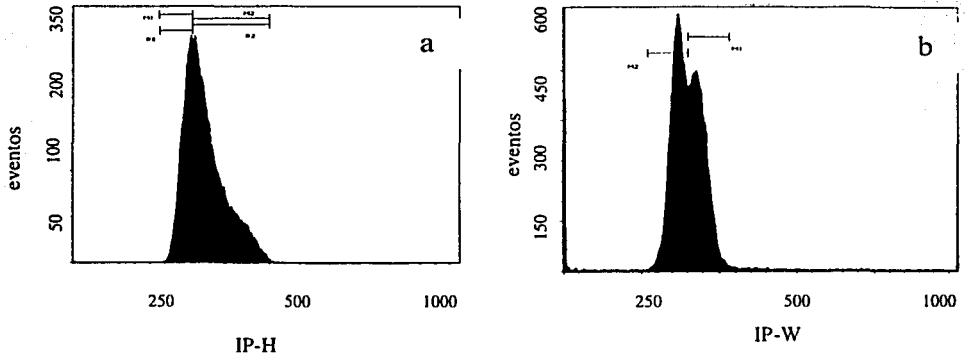


Figura 10a. El histograma muestra la región correspondiente a los espermatozoides seleccionados en el gráfico de puntos, permitiendo observar la presencia de dos picos demasiado unidos, lo que dificulta la posibilidad de separarlos para someterlos a proceso de selección y recuperación celular. **10b.** Muestra otra perspectiva acerca de la misma región, siendo más clara la presencia de dos picos.

Muestras de cerdo teñidas con NA

En la Figura 11a y 11b, las gráficas de puntos muestran la región donde se localizan los espermatozoides tomando en cuenta el tamaño y la granulosidad de los mismos. La siguiente gráfica de puntos muestra la fluorescencia, permitiendo la localización de los espermatozoides que no se aglomeraron. Con los datos proporcionados por las gráficas de puntos se realizaron dos histogramas: tomando en cuenta el ancho de la fluorescencia (Figura 12a) y la altura (Figura 12b) de la fluorescencia.

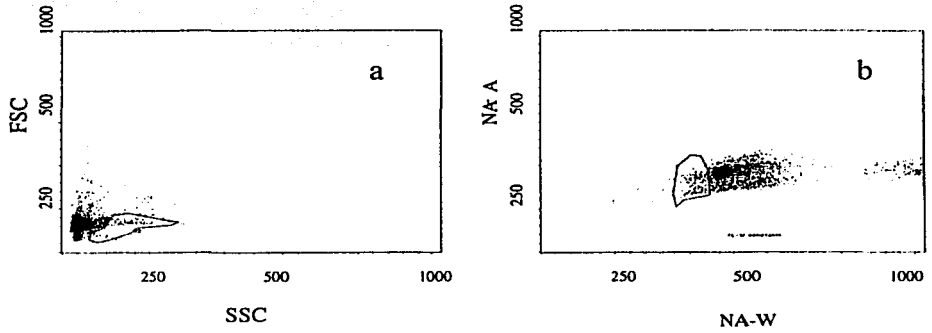


Figura 11a. Gráfica de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides de cerdo teñidos con NA, tomando en cuenta los parámetros de granulosis y tamaño de las células analizadas (FSC-SSC). 11b. Se observa el análisis de los espermatozoides de cerdo teñidos con NA tomando los parámetros de ancho y área de la fluorescencia (NA-W / NA-A).

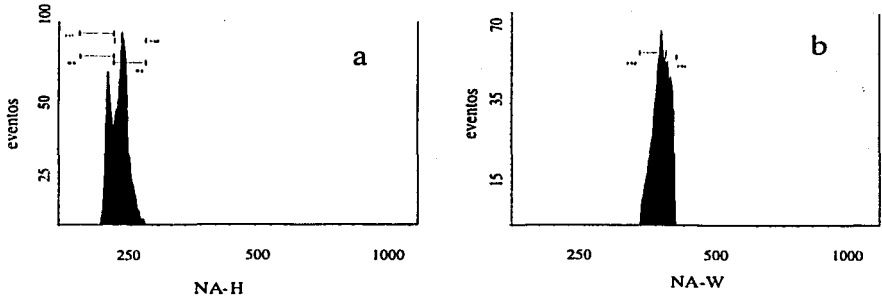


Figura 12a El histograma es obtenido a partir de la información proporcionada por la gráfica de puntos donde se localizó la región de los espermatozoides. Es posible observar dos picos que corresponden posiblemente a dos poblaciones de espermatozoides. **12b.** Histograma que muestra el ancho de la fluorescencia debida al NA. No es posible determinar una separación de espermatozoides en dos poblaciones.

Muestras de toro teñidas con NA

Se realizó el mismo procedimiento mostrando una gráfica de puntos FFS contra SSC (Figura 13a), y otra gráfica de puntos donde se muestra el área contra el ancho de la fluorescencia (Figura 13b). Con los datos proporcionados por estas gráficas se realizaron los siguientes histogramas de flujo, con los mismos parámetros de fluorescencia, altura (figura 14a), ancho (figura 14b)

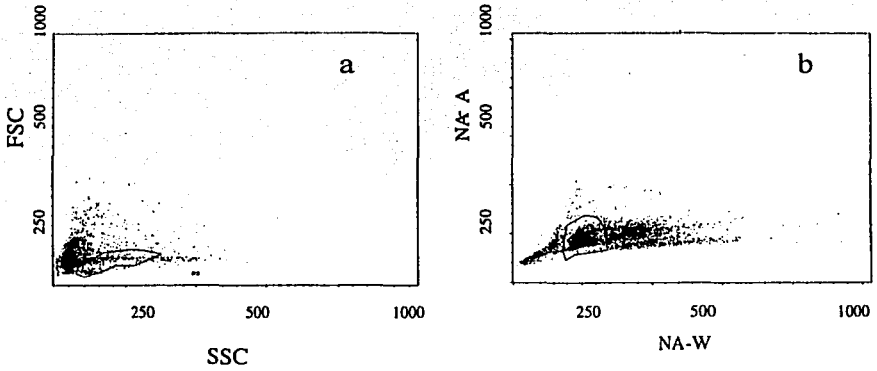


Figura 13a. Gráfica de puntos de acuerdo a la granulosidad y tamaño de las células. Es posible observar una distribución similar a la que presentan las muestras de cerdo. **13b.** Gráfica de puntos de acuerdo al ancho de la fluorescencia del NA intercalado en el DNA de los núcleos de los espermatozoides. La dispersión de los puntos se muestra de forma extendida, lo cual dificulta la localización del un grupo representativo de espermatozoides no agregados.

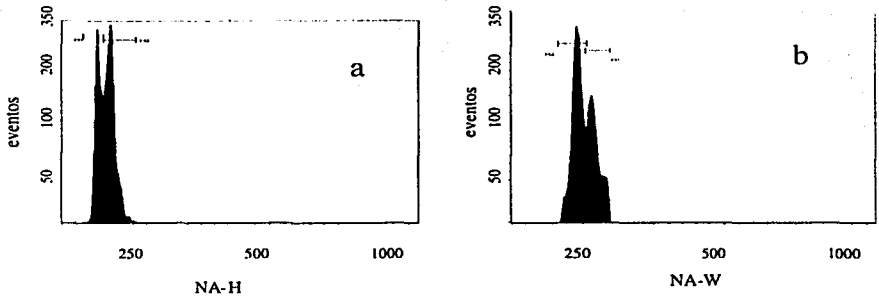


Figura 14a. Histograma obtenido a partir del gráfico de puntos donde se localizó la región de los espermatozoides. Es posible observar la presencia de dos picos que posiblemente corresponden a dos poblaciones de espermatozoides, a pesar de la distancia tan marcada que presentan, debido a que por presentar una diferencia de solo el 4% entre los que contienen el cromosoma X y el Y, deben presentarme más unidos los picos. 14b Histograma en el cual es posible observar la presencia de dos picos que posiblemente corresponden a dos poblaciones.

Muestras de cerdo teñidas con SG

Como punto final del presente trabajo se probó el colorante vital SG, utilizando muestras de espermatozoides viables.

La forma en que se presentan los resultados corresponde a la misma que se empleó para los otros colorantes, mostrando una gráfica de puntos donde se mide la granulosidad contra el tamaño celular, FSC contra SSC (Figura 15a), y otro tomando en cuenta el ancho y área de fluorescencia (Figura 15b) Además se muestran dos histogramas confrontando el conteo celular contra el ancho (Figura 16a) y altura (Figura 16b) de la fluorescencia emitida por el SG.

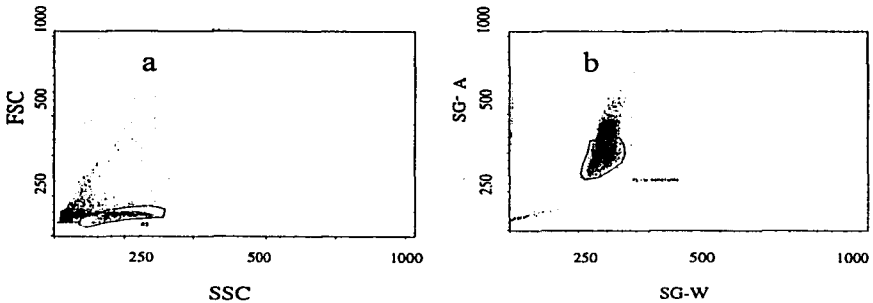


Figura 15a. Gráfica de puntos, en ella es posible observar una disposición similar a la que se observa en las muestras teñidas con IP o NA. 15b. Gráfica de puntos donde se tomó como parámetro el ancho de la fluorescencia, se observa una disposición similar a la observada con las muestras teñidas con IP. De ésta gráfica se tomó la región de los espermatozoides no agregados para su análisis en los histogramas.

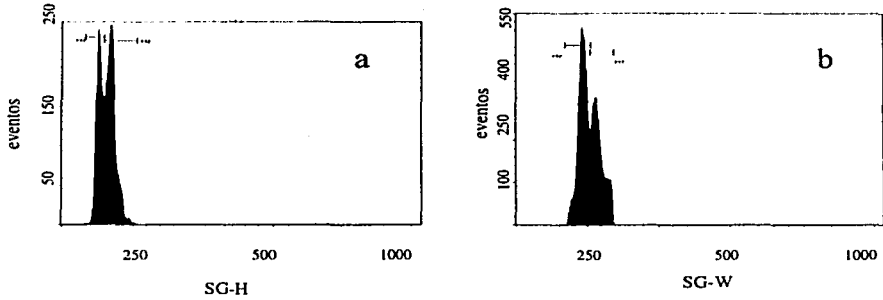


Figura 16a. El histograma es obtenido a partir de la información proporcionada por el gráfico de puntos donde se localizó la región de los espermatozoides. Es posible observar dos picos que podrían corresponder a dos poblaciones de espermatozoides, aunque es muy notoria su separación, la cual haría dudar de la veracidad de que sean dos poblaciones. **16b.** Histograma que muestra el ancho de la fluorescencia debida a SG. Es posible observar una separación de espermatozoides en dos poblaciones por la presencia de los picos.

Muestras de toro teñidas con SG.

El mismo procedimiento se realizó con las muestras de toro presentando una gráfica de puntos de FSC contra SSC (Figura 17a), una gráfica de puntos de la fluorescencia (Figura 17b), además de dos histograma mostrando el ancho (Figura 18a) y la altura (figura 18b) de fluorescencia del SG.

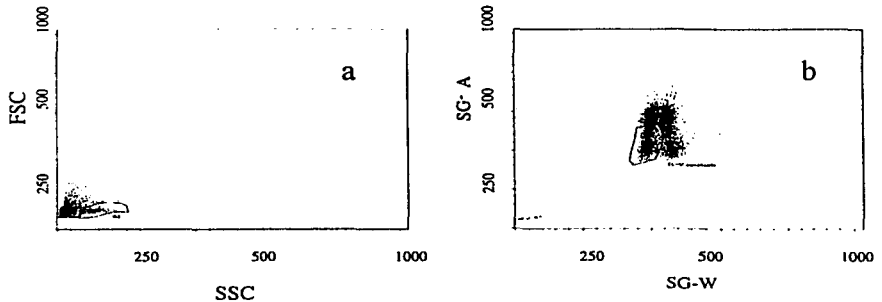


Figura 17a. Gráfica de puntos, es posible observar una disposición similar a la que se observa en las muestras teñidas con IP o NA. **17b.** Gráfica de puntos tomando como parámetros la fluorescencia, se observa una disposición similar a la observada con las muestras teñidas con IP, aunque se observan dos grupos de puntos, de éste gráfico se tomó la región de los espermatozoides no agregados para su análisis en los histogramas.

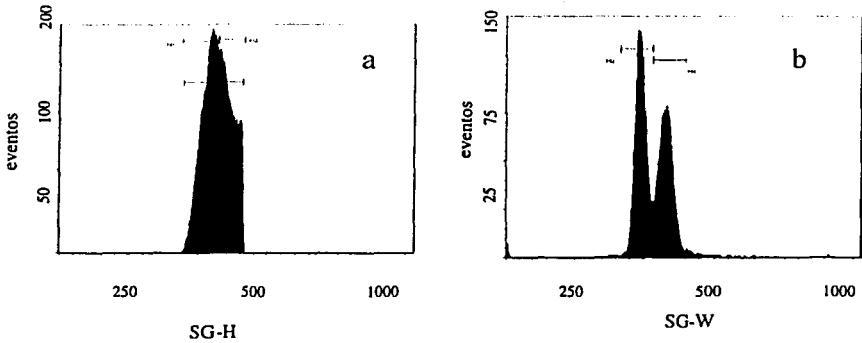


Figura 18a. El histograma es obtenido a partir de la información proporcionada por la gráfica de puntos donde se localizó la región de los espermatozoides. No es posible observar dos picos bien definidos que correspondan a dos poblaciones de espermatozoides, 18b. Histograma que muestra el ancho de la fluorescencia debida a SG, es posible observar una separación de espermatozoides en dos poblaciones por la presencia de los picos, aunque es muy notoria su separación, la cual haría dudar de la veracidad de que sean dos poblaciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tratamiento estadístico de los resultados.

Los resultados de las muestras adquiridas por CF se sometieron a análisis estadístico para determinar la presencia de dos subpoblaciones de espermatozoides en las muestras de semen.

Al analizar la distribución normal de la región de espermatozoides se pudo observar que presentaba una simetría y curtosis perteneciente a la denominada distribución platicúrtica.

La distribución platicúrtica plantea que se puede observar una distribución normal con los extremos más alejados, lo cual se interpreta como la sobreposición de dos poblaciones con varianzas similares pero con medias distintas, pero muy cercanas entre sí.

En el Cuadro 4 se muestran los datos correspondientes a la curtosis de las muestras analizadas, obtenidos por medio del programa S.A.S.

Cuadro 4

Muestras colorante	Cerdos			Toro		
	IP	NA	SG	IP	NA	SG
Curtosis	-0.99166	-0.86414	-1.12344	-0.9589	-0.94249	-1.20338
	-1.03836	-1.10658	-1.18374	-0.85562	0.112154	-0.4556
	-0.78337	-1.25461	-0.99607	-0.81894	-1.0409	-1.18576
	-1.37636	-0.12924	-0.34729	-1.57713	-0.65465	-1.22356
	-1.01322	-0.70332	-1.2258	-0.82478	-0.72953	-0.74475
	-1.44358	-0.60588	-0.70951	-1.23769	-1.38333	-0.39567
	-1.39376	-0.59267	-1.29838	-1.07601	-1.01343	-1.41885
	-0.68276	-0.46881	-0.71356	-0.68993	-0.73578	-1.29638
		-0.27973	-1.16289	-0.87673	-0.71913	-1.51404
		-0.89006	-0.39664	-1.31319	-0.8505	-0.76008
			-0.31803		-0.60411	-1.44047
					-0.63529	
Promedio	-1.32117	-0.70533	-1.19407	-1.43662	-1.06563	-1.27636

Cuadro 4 Valores de curtosis de cada muestra con los diversos colorantes. Muestras los valores de cada una de las muestras analizadas y teñidas con los diferentes fluorocromos empleados para observar el contenido de DNA de los espermatozoides. Como se puede observar todos los valores obtenidos, ya sea en forma independiente o en promedio por especie y colorante, son menores a cero, lo que indica que la distribución que presentan es platicúrtica.

La forma en que se analizaron los resultados fue la siguiente:

Partiendo de la información obtenida en el citómetro de flujo, con respecto a la distribución de la población de espermatozoides donde se observan los dos picos, se tomaron y procesaron los resultados, por medio del análisis de una distribución normal, la cual plantea que una g_1 y g_2 significativamente menores a cero indica que la muestra presenta una distribución platicúrtica conteniendo dos poblaciones normales con iguales varianzas pero con diferentes medias. La g_1 y g_2 en una muestra estadística, corresponden a los valores estimados a partir de los parámetros de las poblaciones analizadas. En donde:

$$k_3 = \frac{n \sum (X_i - \bar{X})^3}{(n-1)(n-2)}$$

$$g_1 = \left(\frac{k_3}{s^3} \right) = \left(\frac{k_3}{\sqrt{(s^2)^3}} \right)$$

$$k_4 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^4 n(n+1)(n-1) - 3 \left[\sum (X_i - \bar{X})^2 \right]^2}{(n-2)(n-3)}$$

$$g_2 = \left(\frac{k_4}{s^4} \right)$$

k_3 y k_4 son los coeficientes de K. Pearson, s es la varianza, X_i es la muestra i , \bar{X} es la media, n es el número de muestra y g son los factores de la curtosis de Pearson.

Como no todas las distribuciones simétricas son normales, estadísticamente se pueden diferenciar evaluando la forma de una distribución, con respecto a la normalidad, empleando el cuarto poder de la desviación de las medias proporcionando una medida llamada curtosis.

La curtosis de una población por lo regular se caracteriza por presentar "picos", que puede ser de tres tipos, mesocúrticos o normales de una sola población, leptocúrticos de dos poblaciones con la misma media y platicúrtica (Figura 19), de dos poblaciones con medias diferentes aunque muy cercanas entre sí (64-66).

Para confirmar la presencia de dos poblaciones con media muy cercanas entre sí es necesario el planteamiento de hipótesis a confirmar o a rechazar.

La hipótesis alterna (H_A) plantea que si:

$g_2 < 0$ entonces la distribución será platicúrtica, normal pero con dos medias muy cercanas entre sí.

La hipótesis nula (H_0) plantea que si:

$g_2 > 0$ entonces la distribución será normal con una sola población.

Se pudo constatar con el presente estudio es que a pesar de obtener valores menores a cero y confirmar la presencia de dos poblaciones, estas se encuentran tan unidas que es difícil separarlas con el equipo de citometría de flujo.



Figura 19 Distribución PLATICURTICA de dos poblaciones por simetría y curtosis.

DISCUSIÓN

Este proyecto tuvo como objetivo primordial estandarizar las técnicas para teñir espermatozoides con la finalidad de determinar la cantidad relativa de DNA en los espermatozoides de toros y cerdos por medio de CF. Lo primero fue localizar las zonas en las cuales, las referencias bibliográficas y estudios de citometría previamente realizados indicaban la localización de los espermatozoides de acuerdo a la fluorescencia emitida.

Se analizó la distribución de los espermatozoides de acuerdo a su tamaño y granulosidad, esto brindó el primer parámetro para iniciar el presente trabajo.

Se procedió a analizar las regiones y compararlas con los datos encontrados en la literatura, se probaron diversos medios para lavar y resuspender las muestras de semen, que fueron utilizadas en el CF.

El primer medio que se utilizó fue el PBS con BSA al 1%, como se mencionaba en la literatura: Este no resultó ser el amortiguador adecuado, ya que incrementó la agregación de los espermatozoides, que se pegaron a las paredes de las mangueras del equipo; provocando lecturas falsas y a la larga obstrucciones del equipo, lo que trajo como consecuencia un retraso en la obtención de resultados.

Posteriormente, se utilizó PBS solo, sin embargo, al momento de tratar de recuperar los espermatozoides, estos se perdían, por lo cual se procedió a sustituirlo por TNE (Tris-NaCl-EDTA).

El TNE brindó mejores resultados permitiendo recuperar a los espermatozoides íntegros y sin aglutinarse.

Lo siguiente fue probar las soluciones acarreadoras para que corrieran las muestras dentro del citómetro. El primero en utilizarse fue el FACSFlow (solución recomendada por BD para adquirir y recupera las muestras celulares en el CF), pero no permitió obtener buenos resultados, por lo cual se sustituyó por PBS. Este se utilizó recién preparado y no se logro obtener resultados favorables, por lo cual se procedió a filtrarlo, ajustarle el pH a 7.4 y después enfriarlo, debido a que el proceso de adquisición, selección y recuperación de los espermatozoides al parecer aumenta la temperatura de la solución, lo que provoca que los espermatozoides no pudieran ser recuperados. Con esta medida fue posible obtener mejores resultados.

Ya lograda la primera fase que era obtener los medios apropiados para la adquisición, se procedió a probar las concentraciones óptimas para una buena tinción, además de los tiempos apropiados para que el colorante penetrara a la célula y se fijara al DNA. Esto se realizó para el IP, NA Y SG, definidas las concentraciones óptimas se procedió a utilizarlas con las muestras de semen que serían registradas en el presente trabajo.

La región de los espermatozoides fue determinada y los resultados fueron analizados en histogramas de frecuencia contra fluorescencia FL2. Dicha región fue seleccionada y recuperada en tubos de 50 ml recubiertos con BSA al 1%, las muestras recuperadas se centrifugaron, con la finalidad de concentrarlas y efectuarles un segundo análisis, por medio

de CF o por PCR con sondas específicas del cromosoma Y de bovino y sondas específicas de humano que cruzan con las de cerdo. Las amplificaciones fueron corridas por electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

Esta técnica puede verificar la adecuada separación de las subpoblaciones de espermatozoides con el cromosoma X o el cromosoma Y, pero solo fue realizada en dos ocasiones y no fue posible confirmar que las muestras procesadas por medio de PCR fueran de una población de espermatozoides con el cromosoma X, debido a que mostraban secuencias específicas del cromosoma Y. No se pudieron realizar mayor número de pruebas, debido a problemas con la parte del selector y recuperador de células del equipo y tuvieron que ser suspendidas; razón por la cual solo se especula y no se afirma que los picos antes presentados correspondan a dos poblaciones distintas, esto debido a que no se pudieron hacer una mayor cantidad de pruebas de PCR para confirmar la separación. Sin embargo, con los resultados presentados en forma estadística y las referencias hasta el momento encontradas, se puede concluir que se logró la diferenciación de las dos poblaciones de espermatozoides. Las muestras que se lograron recuperar fueron sometidas a un análisis al microscopio óptico, para corroborar la presencia de espermatozoides en el volumen de recuperación. Los tiempos de centrifugación se estandarizaron como se muestra en la metodología y la observación al microscopio mostró muy pocos espermatozoides por campo. Aunque los que se encontraban estaban íntegros.

Con base en lo anterior, se podría considerar que a pesar de que el CF es capaz de localizar la región espermática y mostrar dos posibles picos correspondientes a las dos subpoblaciones de espermatozoides, estas se encuentran tan cercanas una de la otra que no fue posible una adecuada separación, y si una muy posible contaminación de muestras de espermatozoides X con espermatozoides que contienen el cromosoma Y. No se puede descartar un problema metodológico, factible de ser modificado y corregido, en cuanto el equipo se encuentre en condiciones de volver a trabajar con las muestras de espermatozoides.

A pesar de las dificultades presentes en este trabajo, los resultados presentados servirán como base para manejar de una forma adecuada las muestras, ya sea modificando otros parámetros en el equipo utilizado o bien manejar las muestras con un equipo más avanzado. Este sería el caso de un CF con la capacidad de reorientar el láser y separar por medio de cargas eléctricas las dos poblaciones a la vez y descartando en un tubo a aquellos espermatozoides a los cuales no se puedan colocar ya sea en el tubo de recuperación de espermatozoides X o de espermatozoides Y.

En la actualidad ya se determinaron las concentraciones óptimas de NA y SG, para analizar tanto la eficiencia como la variabilidad en la cuantificación del DNA de espermatozoides de bovinos y cerdos, comparado con los resultados obtenidos con IP.

CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados al inicio del presente trabajo, se concluye lo siguiente:

Se lograron establecer las condiciones adecuadas en las cuales deben ser preparadas las muestras para su análisis por medio de citometría de flujo.

El análisis por medio de citometría de flujo permitió ubicar la región de los espermatozoides de toro y cerdo, utilizando los parámetros de tamaño y granulosidad (FSC y SSC), lo cual permitirá usar dichas regiones para proseguir con los trabajos experimentales que permitan lograr una separación exitosa de muestras de semen viable.

Los fluorocromos utilizados (IP y NA) fueron eficientes para teñir el DNA de los espermatozoides, además de que permitieron comparar la ubicación de la población espermática y corroborar su localización en el mismo canal de fluorescencia.

La distribución de la población espermática de acuerdo a la intensidad de fluorescencia emitida por los dos fluorocromos, permitió observar la presencia de dos picos, los cuales indican la presencia de dos subpoblaciones diferentes en su contenido de DNA.

Los datos obtenidos a lo largo del trabajo indican que se logró separar y recuperar una población espermática, a pesar de que no fue posible corroborar a cual de las dos subpoblaciones correspondían, dichas células.

Se logró estandarizar y corroborar el uso del SG como Fluorocromo específico de DNA, y a pesar de mostrar una disposición diferente a la que presentaron los espermatozoides con IP y NA, fue posible la recuperación de células con buenas características de integridad celular.

Esto abre un camino para proseguir con los experimentos que permitan en un futuro no muy lejano la adquisición de células viables a menores costos de los que implica la separación de espermatozoides por medio de equipos especializados pero más costosos y muy lejanos de las posibilidades de nuestro país.

Después del trabajo realizado se puede considerar se requieren de estudios adicionales, para lograr comprobar la separación en dos subpoblaciones a los espermatozoides, por lo que es necesario continuar con los experimentos con el uso del SG y de ser posible con un equipo de citometría mas avanzado.

Perspectivas

Los estudios realizados hasta el momento han permitido desarrollar la base para intentar una posible separación de espermatozoides en dos subpoblaciones distintas y de ser posible lograr la recuperación de espermatozoides viables para su posterior utilización, a un costo menor al que implica la compra de un equipo especializado para el sexado. Esto brindaría una alternativa de selección en el ganado productor de leche o de carne en la ganadería nacional y en el desarrollo de pjaras de un sexo determinado. Es necesario realizar un mayor número de ensayos para determinar con mayor eficiencia la separación de las dos

poblaciones, así como la viabilidad de los espermatozoides para que posteriormente puedan ser utilizados tanto en programas de inseminación artificial como de fertilización in vitro.

El equipo se planea utilizar es el FACS Vantage, el cual tiene la capacidad de realizar pruebas comparativas con el fluorocromo Hoechst 33342, además de la utilización del Syto Green, lo cual brindará una mejor alternativa al planteamiento inicial de nuestro trabajo: realizar un sexado espermático eficiente con los medios disponibles y que se tienen a nuestro alcance, empleando semen sexado en la práctica cotidiana de la FIV que se lleva a cabo en los laboratorios de la UAM-I y de la Facultad de MVZ de la UNAM, para obtener embriones de un sexo determinado, de acuerdo a su utilidad zootécnica. Todo esto permitirá demostrar que no es necesaria la utilización de un láser UV y de Hoechst para la separación de los espermatozoides en dos poblaciones.

De esta manera, se buscará implementar una técnica eficiente, práctica y económica para la utilización del semen sexado en la ganadería de nuestro país.

BIBLIOGRAFIA

1. Seidel GE, Jr. and Johnson LA, Sexing mammalian sperm--overview, 1999. *Theriogenology* 52: 1267-72.
2. Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D and Polge C, Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilisation, 1993. *Vet Rec* 132: 40-1.
3. Hohenboken WD, Applications of sexed semen in cattle production, 1999. *Theriogenology* 52: 1421-33.
4. Lu KH, Cran DG and Seidel GE, Jr., In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm, 1999. *Theriogenology* 52: 1393-405.
5. Johnson LA and Welch GR, Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency, 1999. *Theriogenology* 52: 1323-1341.
6. Johnson L, Welch GR and Rens W, The Beltsville Sperm Sexing Technology: High-speed sperm sorting give improved sperm output for in vitro fertilitation an AI, 1999. *J. Anim Sci* 77 **suplemento 2**: 213-220.
7. Welch GR and Johnson LA, Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA, 1999. *Theriogenology* 52: 1343-52.
8. Bohinski C. *Bioquímica*. Adisson-Wesley Iberoamericana. 2ª. México DF, 1987.

9. Callen J. *Biología Celular de las moléculas a los organismos*. Ed. Continental. México DF, 2000.
10. Lehninger L. *El DNA y la estructura del material genético*. Ed. Omega. 2ª. Barcelona España, 1982.
11. Chassoux D, Franchi J, Cao TT and Debey P, DNA content by in situ fluorescence imaging and S-phase detection, with chromatin structure preserved, 1999. *Anal Quant Cytol Histol* 21: 489-97.
12. Crissman HA and Steinkamp JA, Cell cycle-related changes in chromatin structure detected by flow cytometry using multiple DNA fluorochromes, 1993. *Eur J Histochem* 37: 129-38.
13. Golan R, Weissenberg R, Oschry Y, Shochat L and Lewin LM, Spermatogenesis in the golden hamster during the first spermatogenic wave: a flow cytometric analysis, 2000. *Mol Reprod Dev* 55: 205-11.
14. Hendriksen PJ, Do X and Y spermatozoa differ in proteins?, 1999. *Theriogenology* 52: 1295-307.
15. Hernández P and Ballesteros L. *Biología molecular del espermatozoide de mamíferos*. Editorial de la Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F, 1998.
16. Watanabe Y, Seshimo Z, Maesaka H, Hisada T and Heyden G, The application of microspectrocytofluorometric measurement of Feulgen nuclear DNA content in experimental tumors of rat submandibular gland, 2. The correlation between proliferative

- ability and nuclear DNA content of tumor tissue in autotransplanted areas, 1987. *J Oral Pathol* 16: 81-8.
17. Carey FA, Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: principles and applications, 1994. *J Pathol* 172: 307-12.
18. Caspersson TO, History of the development of cytophotometry from 1935 to the present, 1987. *Anal Quant Cytol Histol* 9: 2-6.
19. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF and Coulter JR, Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement, 1969. *Science* 163: 1213-4.
20. Fulwyler MJ, Electronic separation of biological cells by volume, 1965. *Science* 150: 910-1.
21. Fulwyler MJ, Further development of the cell separator. LA-3610-MS, 1966. *LA Rep* 222-4.
22. Fulwyler MJ, Glascock RB and Hiebert RD, Device which separates minute particles according to electronically sensed volume, 1969. *Rev Sci Instrum* 40: 42-8.
23. Fulwyler MJ, Status quo in flow-through cytometry, 1974. *J Histochem Cytochem* 22: 605-6.
24. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Kapuscinski J, Staiano-Coico L and Melamed MR, Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells, 1984. *Cytometry* 5: 355-63.

25. Recktenwald DJ, Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration, 1993. *J Hematother* **2**: 387-94.
26. Braylan RC, Attributes and applications of flow cytometry, 1983. *Ann Clin Lab Sci* **13**: 379-84.
27. Rua S, Comino A and Fruttero A, [Utility and limitations of flow cytometry DNA content analysis in neoplastic cells], 1991. *Pathologica* **83**: 421-39.
28. Tiersch TR, Chandler RW, Wachtel SS and Elias S, Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content, 1989. *Cytometry* **10**: 706-10.
29. Kamensky LA and Melamed MR, Spectrophotometric cell sorter, 1967. *Science* **156**: 1364-5.
30. Moruzzi JF, Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa, 1979. *J Reprod Fertil* **57**: 319-23.
31. Johnson LA, Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm, 1992. *J Anim Sci* **19**: 8-18.
32. Johnson LA and Clarke RN, Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm: activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes, 1988. *Gamete Res* **21**: 335-43.
33. Dean PN, Pinkel D and Mendelsohn ML, Hydrodynamic orientation of sperm heads for flow cytometry, 1978. *Biophys J* **23**: 7-13.

34. Gledhill BL, Cytometry of deoxyribonucleic acid content and morphology of mammalian sperm, 1983. *J Dairy Sci* **66**: 2623-34.
35. Gledhill BL, Lake S, Steinmetz LL, Gray JW, Crawford, Jr., Dean PN and Van Dilla MA, Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution, 1976. *J Cell Physiol* **87**: 367-75.
36. Johnson LA and Pinkel D, Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa, 1986. *Cytometry* **7**: 268-73.
37. Rens W, Welch G and Johnson L, Improved flow cytometric sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm: substantial increase in yield of sexed semen, 1999. *Molec Reprod Dev* **52**: 50-56.
38. Rens W, Welch GR and Johnson LA, A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome-bearing sperm, 1998. *Cytometry* **33**: 476-81.
39. Johnson LA, Flook JP, Look MV and Pinkel D, Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations, 1987. *Gamete Res* **16**: 1-9.
40. Garner DL and Johnson LA, Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide, 1995. *Biol Reprod* **53**: 276-84.
41. Skowronski J, Plucienniczak A, Bednarek A and Jaworski J, Bovine 1.709 satellite. Recombination hotspots and dispersed repeated sequences, 1984. *J Mol Biol* **177**: 399-416.

42. Blecher SR, Howie R, Li S, Detmar J and Blahut LM, A new approach to immunological sexing of sperm, 1999. *Theriogenology* **52**: 1309-21.
43. Welch GR, Waldbieser GC, Wall R and Johnson LA, Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X and Y chromosome bearing bovine sperm, 1995. *Anima Biotechnol* **6**: 131-139.
44. Ali JI, Eldridge FE, Koo GC and Schanbacher BD, Enrichment of bovine X- and Y-chromosome-bearing sperm with monoclonal H-Y antibody-fluorescence-activated cell sorter, 1990. *Arch Androl* **24**: 235-45.
45. Hendriksen PJ, Tieman M, Van der Lende T and Johnson LA, Binding of anti-H-Y monoclonal antibodies to separated X and Y chromosome-bearing porcine and bovine sperm, 1993. *Mol Reprod Dev* **35**: 189-96.
46. Capparelli R, Cottone C, D'Apice L, Viscardi M, Colantonio L, Lucretti S and Iannelli D, DNA content differences in laboratory mouse strains determined by flow cytometry, 1997. *Cytometry* **29**: 261-6.
47. Cunningham RE, Fluorescent labeling of DNA, 1999. *Methods Mol Biol* **115**: 271-3.
48. Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, Galbraith DW and Price HJ, Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei, 1999. *Am J Bot* **86**: 609.
49. Latt SA, Marino M and Lalande M, New fluorochromes, compatible with high wavelength excitation, for flow cytometric analysis of cellular nucleic acids, 1984. *Cytometry* **5**: 339-47.

50. Libbus BL, Perreault SD, Johnson LA and Pinkel D, Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoechst 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting, 1987. *Mutat Res* **182**: 265-74.
51. Johnson LA and Clarke RN, Sperm DNA and sex chromosome differences between two geographical populations of the creeping vole, *Microtus oregoni*, 1990. *Mol Reprod Dev* **27**: 159-62.
52. Johnson LA, Flook JP and Hawk HW, Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting, 1989. *Biol Reprod* **41**: 199-203.
53. Fugger EF, Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm, 1999. *Theriogenology* **52**: 1435-40.
- 54.
55. Cunningham RE, Overview of flow cytometry and fluorescent probes for cytometry, 1994. *Methods Mol Biol* **34**: 219-24.
56. Cunningham RE, Overview of flow cytometry and fluorescent probes for cytometry, 1999. *Methods Mol Biol* **115**: 249-56.
57. Lush J, The possibility of sex control artificial insemination with centrifuged spermatozoa., 1925. *J Ag Res* **30**: 893-913.
58. Maxwell WM and Johnson LA, Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation, 1997. *Mol Reprod Dev* **46**: 408-18.

59. Maxwell WM and Johnson LA, Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma, 1999. *Theriogenology* 52: 1353-62.
60. Martínez E, Vázquez J, Roca J, Lucas X, Gill M and Parrilla I, Sexaje de espermatozoides en la especie porcina, 1999. *ACONTECER Porcino junio-julio*: 4-13.
61. Maxwell WM, Welch GR and Johnson LA, Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma, 1996. *Reprod Fertil Dev* 8: 1165-78.
62. Kawarasaki T, Welch GR, Long CR, Yoshida M and Johnson LA, Verification of flow cytometrically-sorted X- and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, 1998. *Theriogenology* 50: 625-35.
63. Vidal F, Fugger EF, Blanco J, Keyvanfar K, Catala V, Norton M, Hazelrigg WB, Black SH, Levinson G, Egozcue J and Schulman JD, Efficiency of MicroSort flow cytometry for producing sperm populations enriched in X- or Y-chromosome haplotypes: a blind trial assessed by double and triple colour fluorescent in-situ hybridization, 1998. *Hum Reprod* 13: 308-12.
64. Daniel W. *Bioestadística Base para el análisis de las ciencias de la salud*. LIMUSA. 7a reimp. México, 1992.
65. Mahony M. *Sensory evaluation of food*. Inc. Marcel Dekker. U.S.A., 1985.
66. Zar J. *Biostatistical Analysis*. electronic Technical Publishing. U.S.A., 1996.

ANEXO I

Análisis estadístico de los promedios de las muestras de toro y cerdo teñidas con Yoduro de Propidio, Naranja de Acridina y Syto Green.

Se presentan solo los valores más representativos de cada grupo manejado.

Cerdos con Yoduro de Propidio

promedio

Moments

N	145	Sum Wgts	145
Mean	237.221	Sum	34397.04
Std Dev	160.31	Variance	25699.3
Skewness	-0.02944	Kurtosis	-1.32117
USS	11860398	CSS	3700699
CV	67.57834	Std Mean	13.31302
T:Mean=0	17.81872	Prob> T	0.0001
Sgn Rank	5292.5	Prob> S	0.0001
Num ^= 0	145		
W:Normal	0.901067	Prob<W	0.0001

Quantiles (Def=5)

100% Max	496.625	99%	494.5
75% Q3	363.875	95%	477.375
50% Med	254.625	90%	457.125
25% Q1	73.25	10%	13.75
0% Min	0.75	5%	7.875
		1%	1.125

Range	495.875
Q3-Q1	290.625
Mode	13.75

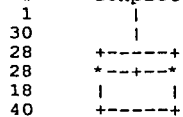
Extremes

Lowest	Obs	Highest	Obs
0.75 (2)	488.125 (93)
1.125 (1)	489.375 (95)
2.125 (3)	494.375 (94)
2.75 (4)	494.5 (96)
3.75 (6)	496.625 (92)

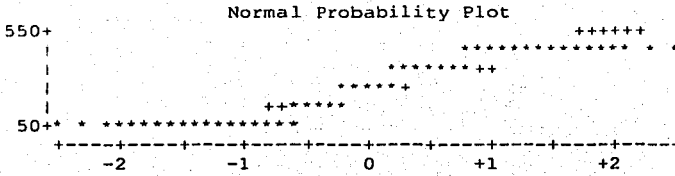
Stem Leaf

5	0	#	1
4	001111223444555667777888889999		30
3	00122223333444455566678899		28
2	00112222333444555667777888999		28
1	011123344456678899		18
0	0000001111111111222233334444555666777889		40

Boxplot

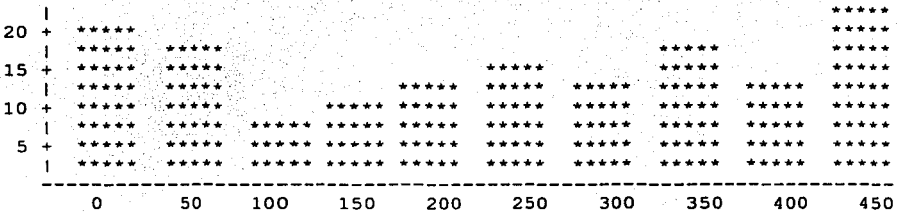


Multiply Stem.Leaf by 10**+2



FREQUENCY OF PROM

FREQUENCY



Toros con Yoduro de Propidio

PROMEDIO

Moments

N	156	Sum Wgts	156
Mean	106.6391	Sum	16635.7
Std Dev	86.72411	Variance	7521.071
Skewness	0.298802	Kurtosis	-1.43662
USS	2939782	CSS	1165766
CV	81.32487	Std Mean	6.943486
T:Mean=0	15.35815	Prob> T	0.0001
Sgn Rank	6123	Prob> S	0.0001
Num ^= 0	156		
W:Normal	0.858895	Prob<W	0.0

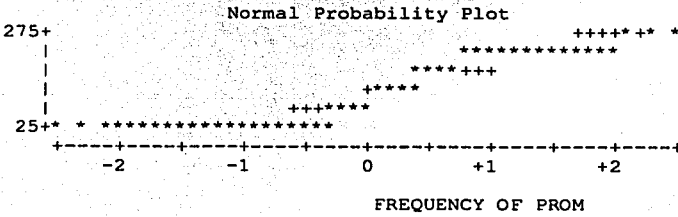
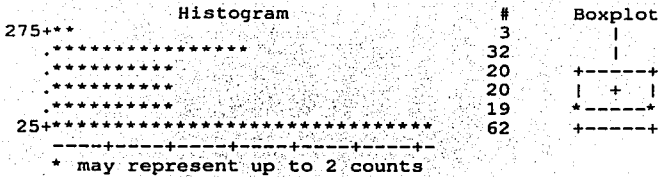
Quantiles (Def=5)

100% Max	253.3	99%	250.2
75% Q3	192	95%	241.6
50% Med	93.45	90%	233.7
25% Q1	20.85	10%	6.1
0% Min	0.1	5%	2.9
		1%	1

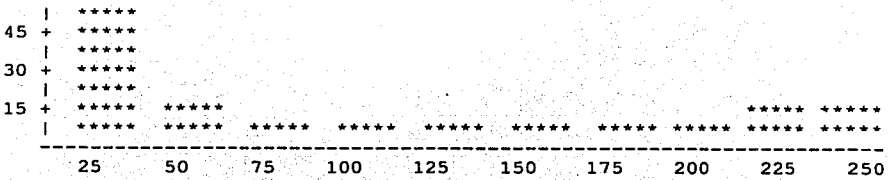
Range	253.2
Q3-Q1	171.15

Mode 5.2

Extremes			
Lowest	Obs	Highest	Obs
0.1(2)	245.8(101)
1(4)	249.4(97)
1.1(3)	250.1(103)
1.4(1)	250.2(102)
2(155)	253.3(105)



FREQUENCY



Cerdos con Naranja de Acridina

PROMEDIO

Moments

N	162	Sum Wgts	162
Mean	71.48642	Sum	11580.8
Std Dev	30.91159	Variance	955.5266
Skewness	-0.3637	Kurtosis	-0.70533
USS	981709.7	CSS	153839.8
CV	43.24121	Std Mean	2.428644
T:Mean=0	29.4347	Prob> T	0.0001
Sgn Rank	6601.5	Prob> S	0.0001
Num ^= 0	162		
W:Normal	0.932656	Prob<W	0.0001

Quantiles (Def=5)

100% Max	124.7	99%	121.7
75% Q3	94.8	95%	116.9
50% Med	75.3	90%	112
25% Q1	48.8	10%	24.1
0% Min	4	5%	17.9
		1%	6
Range	120.7		
Q3-Q1	46		
Mode	73.6		

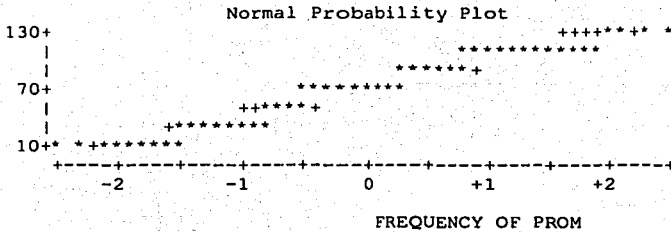
Extremes

Lowest	Obs	Highest	Obs
4 (162)	119.8 (62)
6 (2)	121 (64)
6.8 (3)	121.5 (65)
6.9 (4)	121.7 (74)
7.5 (1)	124.7 (68)

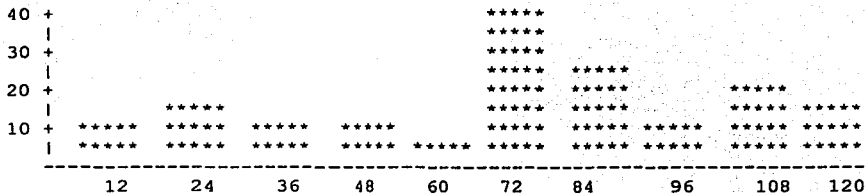
Histogram

	#	Boxplot
130+*	4	
.+*****	32	
.+*****	25	+-----+
70+*****	53	+-----+
.+*****	15	+-----+
.+*****	22	
10+*****	11	

* may represent up to 2 counts



FREQUENCY



Toros con Naranja de Acridina

PROMEDIO

		Moments	
N	113	Sum Wgts	113
Mean	102.4808	Sum	11580.33
Std Dev	51.95252	Variance	2699.064
Skewness	-0.64259	Kurtosis	-1.06563
USS	1489057	CSS	302295.2
CV	50.69487	Std Mean	4.887282
T:Mean=0	20.96888	Prob> T	0.0001
Sgn Rank	3220.5	Prob> S	0.0001
Num ^= 0	113		
W:Normal	0.835227	Prob<W	0.0

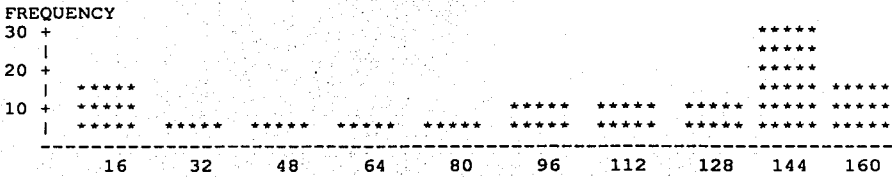
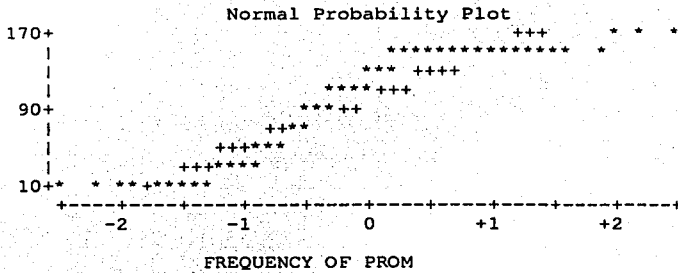
Quantiles (Def=5)			
100% Max	160.4167	99%	160.3333
75% Q3	148.25	95%	156.25
50% Med	121.75	90%	153
25% Q1	59.8333	10%	19
0% Min	2	5%	8.5
		1%	2
Range	158.4167		
Q3-Q1	88.4167		
Mode	2		

Extremes

Lowest	Obs	Highest	Obs
2(113)	156.25(74)
2(110)	158.8333(50)
4(109)	160.1667(47)
7.8333(2)	160.3333(48)
8(112)	160.4167(49)

Stem Leaf	#	Boxplot
16 000	3	
14 00014555666677888888889999000122223344466669	44	+-----+
12 02358991237	11	*-----*
10 01234668578	11	+
8 256670122	9	
6 0110047	7	+-----+
4 2455879	7	
2 023589003	9	
0 224888991389	12	

Multiply Stem.Leaf by 10**+1



Cerdos con Syto Green

PROMEDIO

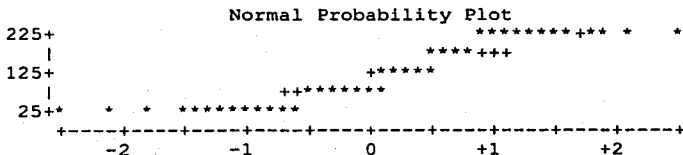
		Moments	
N	91	Sum Wgts	91
Mean	106.3816	Sum	9680.727
Std Dev	78.22234	Variance	6118.735
Skewness	0.265031	Kurtosis	-1.19407
USS	1580538	CSS	550686.1
CV	73.52994	Std Mean	8.19993
T:Mean=0	12.97348	Prob> T	0.0001
Sgn Rank	2093	Prob> S	0.0001
Num ^= 0	91		
W:Normal	0.902236	Prob<W	0.0001

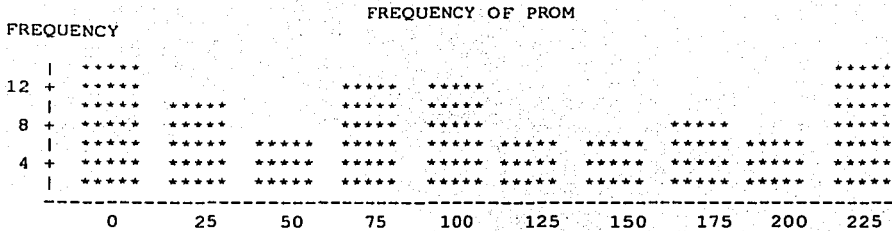
Quantiles (Def=5)			
100% Max	243	99%	243
75% Q3	173.6364	95%	234.2727
50% Med	93.7273	90%	223.3636
25% Q1	30.9091	10%	6.1818
0% Min	0.5455	5%	1.3636
		1%	0.5455
Range	242.4545		
Q3-Q1	142.7273		
Mode	0.8182		

Extremes			
Lowest	Obs	Highest	Obs
0.5455(2)	234.2727(47)
0.8182(4)	235.4545(48)
0.8182(3)	239(50)
1.3636(5)	242(49)
1.3636(1)	243(51)

Stem	Leaf	#	Boxplot
2	000112222333334444	18	
1	555667778999	12	+-----+
1	000001122233344	15	+
0	55566677788888889999	21	*-----*
0	0000000011111111222223344	25	+-----+

Multiply Stem.Leaf by 10**+2





Toros con Syto Green

PROMEDIO

	Moments	
N	141	Sum Wgts 141
Mean	71.01547	Sum 10013.18
Std Dev	44.56393	Variance 1985.944
Skewness	-0.36013	Kurtosis -1.27636
USS	989123	CSS 278032.1
CV	62.75242	Std Mean 3.75296
T:Mean=0	18.92252	Prob> T 0.0001
Sgn Rank	4865	Prob> S 0.0001
Num ^ = 0	139	
W:Normal	0.871162	Prob<W 0.0

Quantiles (Def=5)

100% Max	136	99%	132.0909
75% Q3	110.2727	95%	128.2727
50% Med	83	90%	124.1818
25% Q1	23.1818	10%	3.4545
0% Min	0	5%	1.5455
		1%	0

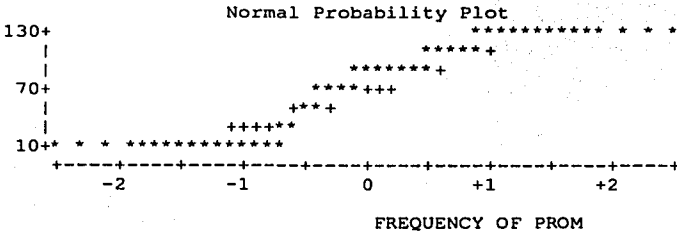
Range	136
Q3-Q1	87.0909
Mode	4

Extremes

Lowest	Obs	Highest	Obs
0(141)	128.8182(61)
0(3)	129(66)
0.3636(2)	129.6364(58)
0.7273(5)	132.0909(60)
0.8182(4)	136(121)

Stem	Leaf	#	Boxplot
12	011223333444445577789999026	27	
10	02558888002234667	17	+-----+
8	0112344455556666689990256688899	31	+-----+
6	000123000113356788	18	+
4	2579459	7	
2	23348957	8	+-----+
0	00011112222233444455570001234679	33	

Multiply Stem.Leaf by 10**+1



FREQUENCY

