

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE UN EQUIPO DE CITOMETRÍA
DE FLUJO Y DE DOS FLUOROCROMOS PARA EL SEXADO DE
SEMEN CONGELADO EN BOVINOS.

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MARIA ISABEL CRUZ GONZALEZ

TUTOR: SALVADOR ROMO GARCIA

COMITE TUTORAL
ROGELIO ALONSO MORALES
JOSE ALFREDO MEDRANO HERNANDEZ

Ciudad Universitaria, México DF

2005

m345661



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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 Alejandra, Ivan y Fernanda
que Dios me dio como fuente de inspiración y de amor.

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

A ti Oswaldo por tu amor, confianza, apoyo y sinceridad
Gracias por estar a mi lado cuando alcanzo una meta
Y por darme tu mano cuando tengo miedo.

Gracias a mis asesores por permitirme aprender de ellos.

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. SALVADOR ROMO GARCÍA por todo su apoyo durante todo el tiempo que compartí, por sus enseñanzas, su ejemplo y su confianza, gracias por enseñarme un nuevo camino para enfocar mi carrera.

Al Dr. ROGELIO ALONSO MORALES por todo su apoyo, trabajo y todo por sus conocimientos, gracias por ser mi asesor.

Al JOSE ALFREDO MEDRANO HERNANDEZ por tener la paciencia y comprensión cuando requerí de su tiempo, por su apoyo durante la tesis, por sus comentarios y críticas a mi trabajo.

A la Dra. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA por su apoyo incondicional durante todo el tiempo que he tenido la fortuna de conocerla y trabajar con su apoyo y respaldo tanto el presente trabajo, como en ocasiones anteriores, por su amistad, conocimientos y paciencia.

A la Dra. LOURDES JUAREZ MOSQUEDA por su apoyo para la conclusión de mi trabajo de tesis.

Al Biólogo VICTOR ROSALES por brindarme el apoyo técnico para el desarrollo de la fase experimental de mi trabajo, por su disposición incondicional para respaldarme y sobre todo gracias.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: María Isabel Cruz
Conzalez
FECHA: 17/ junio/ 2005.
FIRMA: [Firma]

INDICE

	Páginas
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
INDICE.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE FOTOGRAFIAS.....	XI
RESUMEN.....	1
Abstract	2
I INTRODUCCIÓN.....	3
II REVISION DE LITERATURA.....	6
Antecedentes del uso del semen sexado.....	6
Características importantes del cromosoma Y.....	7
Características de los fluorocromos.....	8
Hoechst 33342.....	8
Syto Green 13.....	8
Técnicas de Reproducción Asistida relacionadas al sexado espermático por CF.....	10
Transferencia de embriones producidos por FIV.....	11
Fluorescencia por Hibridación <i>in situ</i> (FISH).....	11
Evaluación morfológica o análisis morfométrico.....	12
Técnicas para confirmar la pureza de las poblaciones seleccionadas.....	12
Factores que influye en el sexado espermático por CF.....	13
Modificaciones que han mejorado la técnica del sexado.....	15

Ventajas del sexado de semen.....	16
Limitantes del sexado espermático	17
Aplicaciones del sexado espermático	18
Relevancia económica del uso del semen sexado.....	18
III Hipótesis.....	21
IV Justificación	22
V OBJETIVOS.....	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos.....	23
VI. MATERIAL Y METODOS	24
Lugar y Fechas.....	24
Preparación de reactivos y soluciones.....	24
Antiguador de Fosfatos Salino (PBS).....	24
Amortiguador TNE	24
Fluorocromos	25
Preparación del H33342.....	25
Preparación del SG13.....	25
Procedimiento	25
Procesamiento de las muestras.....	26
Lavado de las muestras	26
Técnicas de tinción	26
Grupo 1 Tinción con SG13	27

Grupo 2 Tinción con H33342.....	27
Grupo 3 Doble tinción con H33342 y SG13	27
Grupo 4 Tinción de espermatozoides muertos con SG13.....	28
Grupo 5 Tinción de espermatozoides con H33342.....	29
Grupo 6. Tinción de espermatozoides sexados comercialmente con H33342.....	30
Pruebas de viabilidad después del sexado por CF	30
Calibración del citómetro FACS Vantage.....	30
Segundo análisis (reanálisis) por CF de las poblaciones recuperadas	31
Evaluación de la motilidad y vaibilidad de las poblaciones recuperadas.....	31
Análisis Estadístico.....	32
V. RESULTADOS	34
Grupo 1 Muestras teñidas con SG13.....	34
Grupo 2. Muestras teñidas con H33342.....	36
Grupo 3. Muestras con doble tinción H33342 y SG13	38
Grupo 4. Muestras con espermatozoides muertos teñidos con SG13.....	41
Grupo 5. Muestras teñidas con H33342.....	43
Grupo 6. Muestras de espermatozoides comercialmente sexados teñidos con H33342 (control).....	50
VI. DISCUSION.....	52
VII. CONCLUSIONES	56
VIII. Perspectivas	58
IX. BIBLIOGRAFIA	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la muestra analizada, de acuerdo a la altura de la fluorescencia emitida en dos canales de fluorescencia (FL2H vs FL1H respectivamente). Se observan dos poblaciones, una de células maltratadas, que corresponde a la región R5 y una de células con ADN íntegro, localizada en la región R6 que incluyen a las dos sub-poblaciones espermáticas. Esta figura corresponde a el efecto cometa, lo cual dificulta la separación de las poblaciones. 35

Figura 2. Histograma que analizó una muestra teñida con SG13. La región R3 corresponde a dos sub-poblaciones de espermatozoides íntegros muy cercanas entre si, dificultando la separación (R1 región de espermatozoides con cromosoma X, y R2 espermatozoides con cromosoma Y). La región R4 corresponde a las células maltratadas. 35

Figura 3. Gráfica de dispersión de puntos donde es posible observar las dos poblaciones espermáticas teñidas con H33342. La Región R1 corresponde a los espermatozoides con el cromosoma X y en la Región R2 a los espermatozoides con el cromosoma Y; en la región R3 se ubicaron las células dañadas. 37

Figura 4 Histograma en donde se localizaron las sub-poblaciones espermáticas teñidas con H33342. Es posible observar dos picos que corresponden posiblemente a despoblaciones celulares. La Región R6 corresponde a los espermatozoides X, la R7 a los espermatozoides Y; la región R5 corresponde a las células maltratadas. No fue posible la separación de las dos poblaciones. 37

Figura 5. Gráfica de dispersión de puntos donde es posible observar las dos poblaciones espermáticas teñidas con SG13 y H33342, la región R1 con espermatozoides con el cromosoma X y la Región R2 de espermatozoides con el cromosoma Y).

39

Figura 6. Histograma en donde se localizan las regiones de los espermatozoides teñidos con SG13 y H33342. Se observa la presencia de dos picos Los espermatozoides con el cromosoma X en la región R3 y los espermatozoides Y en la región R4. Fue posible observar un tercer grupo, cercano al origen de la gráfica que corresponde a los espermatozoides dañados

40

Figura 7 Gráfica de dispersión de puntos donde se localizan las regiones de los espermatozoides muertos teñidos con SG13, en la región R1 los espermatozoides sobre-teñidos, debido a una degradación de la membrana y del ADN espermático y en la región R2 las dos poblaciones espermáticas unidas

41

Figura 8 Histograma de donde se fueron analizados los espermatozoides muertos teñidos con SG13 observando dos picos. El primero localizado en la región R3, que corresponde a los espermatozoides dañados que están sobre-teñidos. El segundo pico, localizado en la región R4, donde se localizaron las dos sub-poblaciones espermáticas estrechamente unidas, lo que imposibilitó la identificación y la separación.

42

Figura 9. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides teñidos con H33342 sin periodo de incubación, es posible notar la presencia de dos sub-poblaciones. Los espermatozoides X, en la región R1 y los Y en la región R2

45

Figura 10. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides X teñidos con H33342 localizados en la región R1, en un segundo análisis por CF para evaluar el grado de pureza. Se observa un aumento en las células dañadas localizadas cerca del origen. 45

Figura 11. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides Y teñidos con H33342 localizados en la región R2, en un segundo análisis por CF para evaluar el grado de pureza. Se observa muy pocos espermatozoides dañados. 46

Figura 12. Histograma en el que se muestra la presencia de dos poblaciones espermáticas teñidas con H33342. Se observaron tres picos no regiones: la región R5 corresponde a la población Y, región R4 con la población X y dentro de ésta última un segundo pico que podría corresponder a espermatozoides agregados, determinado como región R3. La región R6 corresponde a las células dañadas. 46

Figura 13. Histograma en el que se muestra la población de espermatozoides Y teñidos con H33342 recuperada, en donde solo se hace evidente la presencia de un solo pico o región R4. 47

Figura 14. Histograma en el que se muestra la población de espermatozoides X teñidos con H33342, recuperada, marcada como región R3. El segundo pico o región R4 que con espermatozoides Y que contaminaron la población X, recuperada. Y cercano al origen de la gráfica un barrido cercano al origen que corresponde a células dañadas. 47

Figura 15. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides teñidos con H33342 sin periodo de incubación y recuperados en los primeros 5 minutos después de iniciado el análisis, en la cual es posible notar la presencia de dos sub-poblaciones. 48

Figura 16 Histograma en el que se muestra la distribución reportada en la literatura de las dos sub-poblaciones espermáticas teñidas con H33342, en la cual se observan los picos correspondientes a los espermatozoides X a la derecha y a los Y a la izquierda. 48

17. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides Y teñidos con H33342 localizados en la región R1, que corresponde a la misma ubicación de la sub-población Y de las muestras empleadas en el resto de los grupos experimentales. La formación en cometa corresponde a las células maltratadas. 50

Figura18. Histograma donde se observa la disposición de la población de espermatozoides Y localizados en R2. La región R3 muestra las células maltratadas. 51

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1. Población de espermatozoides con cromosoma Y, recuperada tras ser procesada con SG 13. La mayoría de los espermatozoides están vivos

36

Fotografía 2 Espermatozoides Y recuperados en su mayoría vivos, teñidos con H33342. Las cabezas espermáticas teñidas de color morado corresponden a espermatozoides muertos, que al presentar una membrana degradada permiten la penetración del colorante. Los espermatozoides vivos y con una membrana íntegra no permiten la penetración del colorante y sus cabezas se observan de color blanco.

38

Fotografía 3. Con la disminución de tiempos y manteniendo la temperatura constante durante el proceso, se observó un mayor número de espermatozoides vivos y una disminución en la cantidad de muertos y dañados

40

Fotografía 4 Muestra de espermatozoides muertos que presentan una alta penetración de fluorocromo en las cabezas.

42

Fotografía 5 Espermatozoides Y recuperados vivos, con menos de 5 minutos de incubación, permitiendo una mejor separación de las poblaciones.

49

Fotografía 6 Espermatozoides X recuperados vivos después de haber sido sexados por CF

49

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue implementar una metodología alternativa al sexado espermático comercial, mediante el empleo de citometría de flujo (CF), analizando el contenido de ADN en semen congelado de bovino, para identificar y separar a los espermatozoides que contienen el cromosoma X o el cromosoma Y, y recuperar las dos sub-poblaciones con óptima viabilidad. Se utilizó un citómetro de flujo FACS Vantage (FV) y los fluorocromos Syto Green 13 (SG13) y Hoechst 33342 (H33342). Los espermatozoides fueron descongelados, lavados con PBS y TNE, teñidos, incubados y analizados por citometría. Las regiones correspondientes a las dos sub-poblaciones fueron determinadas y analizadas en diagramas de dispersión de puntos y la fluorescencia se evaluó en histogramas de frecuencia. Los espermatozoides recuperados fueron colectados y sometidos a un segundo análisis por citometría. En los resultados obtenidos de los grupos teñidos con SG13 y/o H33342 se encontró dificultad para recuperar las poblaciones con un grado de pureza superior al 85% y con una motilidad de por lo menos 70%. El SG13 mostró problemas para la separación de espermatozoides X e Y, mientras que el H33342 mostró un mejor comportamiento para la recuperación de las sub-poblaciones. Después de probar ambos fluorocromos, no se logró una separación adecuada de las dos sub-poblaciones espermáticas. Los espermatozoides recuperados no mostraron daño aparente en su integridad física y al realizar una prueba de viabilidad por tinción con eosina-nigrosina se observó que la mayoría de los mismos estaban vivos. Sin embargo, las poblaciones seleccionadas y recuperadas en su mayoría presentaron una falta de motilidad, lo que dificultó la separación adecuada de las sub-poblaciones. Esto podría estar asociado al proceso previo de congelación y descongelación, ya que las muestras empleadas no eran de semen fresco, sino congelado-descongelado y el medio utilizado para la congelación espermática podría actuar como factor acelerador de la penetración del colorante. Al emplear muestras de espermatozoides muertos, la penetración de los fluorocromos fue mayor y permitió una clara separación de las sub-poblaciones, en contraste con el uso de espermatozoides vivos, posiblemente debido a la mayor permeabilidad de la membrana de las células muertas. Al utilizar como control positivo algunas dosis de semen sexado por una compañía comercial, después de teñirlas con H33342 se confirmó la adecuada localización de los espermatozoides Y. Se puede concluir que el equipo FV funciona adecuadamente para el sexado y separación de espermatozoides congelados-descongelados de toro, aunque no de manera óptima, posiblemente debido al empleo de semen congelado, hecho que pudo alterar los resultados. Se plantea la necesidad de realizar más trabajos de investigación utilizando semen fresco, a fin de confirmar si el proceso de congelación-descongelación afecta negativamente a los espermatozoides al ser sometidos al proceso de sexado por CF. De esta forma podría llevarse a cabo una mejor evaluación de la eficiencia del equipo FV para el sexado espermático.

Palabras Clave: Citometría de flujo, sexado, espermatozoides bovinos, Fluorocromos, Hoechst 33342, Syto Green 13.

ABSTRACT

The objective of this work was to test an alternative methodology for commercial sperm sexing, by the use of flow cytometry (FC), analyzing DNA content in frozen bovine semen, to identify and separate spermatozoa containing an X or Y chromosome, recovering the two sub-populations with optimal viability. A FACS Vantage (FV) Flow Cytometer, and the fluorochromes Syto Green 13 (SG13) and Hoechst 33342 (H33342) were used. Spermatozoa were thawed, washed with PBS and TNE, stained, incubated and analyzed by cytometry. The regions corresponding to the two sub-populations were determined and analyzed in point-dispersion diagrams, and fluorescence was evaluated in frequency histograms. Recovered spermatozoa were collected and exposed to a second analysis by cytometry. In the results obtained from the groups stained with SG13 and/or H33342, it was found difficult to recover the populations with a purity rate higher than 85% and with at least 70% motility. SG13 showed problems for the separation of X and Y spermatozoa, while H33342 showed better results for the recovery of the two sub-populations. After testing both fluorochromes, it was not possible to obtain an adequate separation of the two sperm sub-populations. Recovered sperm cells did not show any apparent physical damage and after performing a viability test with eosin-nigrosin stain, it was observed that most of them were live cells. However, most of the selected and recovered populations showed a lack of motility, which made difficult the proper separation of the sub-populations. This could be associated to the previous freezing and thawing process, since the samples used were not of fresh semen, but frozen-thawed semen and the sperm freezing medium could be a factor that increased the penetration of the stain. When using samples with dead sperm cells, fluorochrome penetration was higher and allowed a clear separation of the sub-populations, in contrast with the use of live spermatozoa, possibly due to the higher permeability of the membranes of dead cells. When some samples of semen sexed by a commercial company were used as a positive control, after stained with H33342, the adequate localization of Y spermatozoa was confirmed. It can be concluded that the FV equipment performs properly for sexing and separation of frozen-thawed bull sperm, but not in an optimal manner, possibly due to the use of frozen semen, which could have altered the results. It is needed to perform more research using fresh semen, to confirm if the freeze-thaw process has an adverse effect on spermatozoa when sexed by FC. By doing this, a better evaluation could be made of the FV's efficiency for sperm sexing.

Key words: Flow Cytometry, sexing, bovine spermatozoa, Fluorochromes, Hoechst 33342, Syto Green 13.

I. INTRODUCCION

Los intentos por determinar el sexo de la progenie se han convertido en una de las principales metas para mejorar los programas reproductivos en el ámbito veterinario, debido a la necesidad de producir individuos de sexo conocido. El contar con esta tecnología implicaría grandes ahorros en recursos económicos y en tiempo, al evitarse gestaciones no deseadas y al mismo tiempo contribuyendo al mejoramiento genético del hato.

Por esta razón se han desarrollado y estudiado diversos métodos de biología celular, que van desde la utilización de gradientes de densidad, hasta el uso de la citometría de flujo (CF). Esta última, basa su potencialidad en la detección de cambios en la fluorescencia emitida por fluorocromos intercalados en el ADN de manera estequiométrica (Johnson, 1987; Cruz, 2002)

Predeterminar el sexo de la progenie ha sido uno de los principales objetivos de múltiples trabajos de investigación a nivel internacional. El desarrollo actual de la investigación, ha llevado al diseño de citómetros especialmente modificados para el sexado espermático. Éstos cuentan con un rayo láser de luz ultravioleta (UV), y emplean el colorante Hoechst 33342 (H33342) como fluorocromo, combinación que actualmente parece ser el sistema más eficiente para dicho fin. Por otra parte, se han desarrollado nuevos colorantes vitales como el Syto Green 13 (SG13), que aún no ha sido probado con espermatozoides vivos.

Tomando como punto de partida los trabajos realizados con anterioridad en un citómetro FACS Calibur, en el cual se estandarizó la metodología para emplear la citometría de flujo como herramienta para realizar el sexado espermático, se planteó la posibilidad de emplear un equipo de CF FACS Vantage, que posee mayor sensibilidad, cuenta con un láser UV que permite la detección de 6 fluorescencias, la separación y recuperación de dos poblaciones simultáneamente a una velocidad promedio de 20,000 células por segundo, permite el uso del H33342 para realizar el sexado de semen congelado de bovino y se maneja en un ambiente Mac OS (sistema operativo Macintosh).

Este equipo está valuado en \$250,000 dólares y existen varios en México, que se utilizan con fines diferentes al sexado espermático.

En la literatura revisada, a nivel internacional se describe el empleo de un equipo MoFlo (DakoCytomation) en el que se ha desarrollado la técnica de sexado espermático por CF. Este equipo cuenta con un láser UV, tiene capacidad para detectar 9 fluorescencias, así como para separar y recuperar poblaciones simultáneamente, analizando en promedio 40,000 células por segundo. A diferencia de los equipos Becton Dickinson (BD), éste se maneja en un ambiente windows para PC. Este equipo tiene un valor aproximado de \$300,000 dólares y al parecer en la actualidad no hay ninguno en nuestro país.

Dentro de los colorantes vitales que se han empleado para el análisis de ADN se encuentra el SG13, del cual no se ha reportado que produzca daño a células eucariontes, ni su empleo en espermatozoides.

Para el presente trabajo, se planteó el empleo de espermatozoides de toro como modelo de estudio para el sexado espermático, debido a la importancia productiva de los bovinos y a la diferencia en concentración de ADN que se reporta en esta especie (Johnson, 1995) entre los espermatozoides X y los Y, que oscila entre 3.8 a 4.0%. Se sabe que las poblaciones de espermatozoides X tienen mayor cantidad de material genético en comparación con los espermatozoides Y, por lo que al teñirlos y obtener la fluorescencia diferencial de dichas poblaciones, estos se pueden separar mediante el uso de CF. De esta manera, con el uso del colorante vital SG 13, sería posible evaluar el contenido de ADN en células vivas, proporcionando un fluorocromo alternativo para realizar el sexado de espermatozoides de bovino, el cual será comparado con H33342, tanto en forma separada como simultánea en una misma muestra, para comparar su eficiencia.

Los experimentos se organizaron en tres grupos, utilizando muestras de semen de toro congeladas lavadas con los amortiguadores PBS y TNE para eliminar el medio de conservación, colocando 40×10^6 espermatozoides/ml en PBS para ser teñidas con SG13, H33342 y en un tercer grupo con ambos colorantes, incubando las muestras por 10 minutos y analizados por CF con el objeto de determinar las

regiones correspondientes a las poblaciones espermáticas: tanto las que contienen el cromosoma X como las que contienen el Y. Los resultados fueron analizados en histogramas de frecuencia usando la fluorescencia de los fluorocromos para la localización de las regiones espermáticas. Los canales de fluorescencia empleados fueron los siguientes:

FL1 empleado para la detección de la auto-fluorescencia;

FL2 se emplea para observar el grado de daño o que tan maltratadas se encuentran las células,

FL3 y FL5 muestra la fluorescencia emitida por los fluorocromos y

SSC muestra la complejidad de las células

FSC muestra la granularidad de las células.

Después de localizar las regiones correspondientes, los espermatozoides se recuperaron y se centrifugaron para concentrarlos. Posteriormente se efectuó un segundo análisis de los mismos por medio de CF, con el objeto de corroborar el sexado, además de hacer una evaluación microscópica para observar y comparar la motilidad y viabilidad de cada muestra.

II. REVISION DE LITERATURA

Antecedentes del uso del semen sexado

Con el descubrimiento del cromosoma sexual en la década de 1910, se inició el estudio de los aspectos reproductivos desde una perspectiva genética. Desde entonces se han desarrollado diversas técnicas para realizar el sexado espermático, entre las cuales la más eficiente hasta la fecha es la citofluorometría o citometría de flujo, que podría convertirse en una de las mejores herramientas para los programas reproductivos en mamíferos (Lush, 1985).

El semen sexado se ha utilizado para fertilización *in vitro* (FIV), inseminación intra uterina (IIU), inseminación artificial convencional (IA), e inyección intra citoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Johnson 1999). Lush (1985), como uno de los precursores del uso del sexado espermático, dio la pauta para el uso de CF basándose en el contenido de ADN para determinar el sexo en espermatozoides de mamíferos, por la presencia o ausencia del cromosoma Y en los mismos.

La preselección del sexo se planteó como una herramienta para acelerar los procesos genéticos, obteniendo progenie de un sexo determinado proveniente de padres con características raciales y/o productivas altamente seleccionadas. A pesar de ello, el sexado presentaba la limitante de su aplicación regional, a menos que se lograra la congelación de las muestras de semen sexado en forma eficiente, para trasladarlas y ser usadas en otros sitios; planteándose que el semen sexado de bovinos puede ser viable hasta por 2 años para su uso comercial en la IA (Schenk *et al.*, 1999).

En la década de los años 70, algunos métodos fueron planteados para la separación de espermatozoides en poblaciones de X y Y, dentro de los cuales se encontraban métodos de centrifugación, sedimentación, columnas de albúmina o la determinación de receptores específicos o marcadores genéticos de superficies antigénicas en los espermatozoides con el cromosoma Y (Welch y Johnson, 1999).

Los métodos modernos para el sexado se pueden agrupar en dos grandes tipos:

1. **Métodos no invasivos.** Son todos aquellos que separan de acuerdo a características físicas o cinéticas como el fraccionamiento sobre columnas de albúmina, filtración en Sephadex, separación electroforética y varios tipos de fraccionamiento de flujo.
2. **Métodos invasivos o genéticos,** que requieren del uso de fluorocromos y/o de sondas que se intercalen en el ADN, permitiendo la diferenciación nuclear de los espermatozoides que contienen el cromosoma X o el Y. Entre estos se encuentran la CF y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Johnson, 1992).

Características importantes del cromosoma Y.

La longitud aproximada del cromosoma Y es un tercio de la del cromosoma X, y al parecer es genéticamente inactivo, por lo que la mayor parte de los genes en el X carecen de su pareja en el Y. Se dice que estos genes están ligados al sexo y tienen un patrón hereditario característico (Page, 2003 online).

El cromosoma Y es un cromosoma que se ha denominado "degenerado", es decir, que la mayor parte de su ADN no tiene sentido, ya que está formado por secuencias que no codifican para proteínas, por lo que se conoce con el nombre de *junk ADN* (ADN basura), a diferencia del cromosoma X que si es funcional. Page y colaboradores (Page, 2003 online) plantean que muchos de los genes en el cromosoma, se encuentran en pares que se intercambian con un compañero en el palíndromo idéntico correspondiente, lo que implicaría una conversión genética Y-Y siendo esto un descubrimiento muy importante que implica un mecanismo para la protección de su funcionalidad e integridad genética. El cromosoma Y es único, tiene largas porciones especulares o "palindrómicas", cuyo tamaño es de aproximadamente 24 millones de pares de bases, a diferencia del cromosoma X, cuyo tamaño aproximado es de 160 millones pares de bases (Lozano, 1997).

Características de los fluorocromos

Hoechst 33342

Es un fluorocromo que satura los pares de bases adenina-timina en la cadena de ADN, se clasifica como un colorante vital (bisbenzimidida fluorescente) sensible a los rayos UV, y se considera como un colorante no citotóxico, que absorbe a 358 nanómetros (nm), excita a 367 nm y emite a 461 nm (Johnson *et al.*, 1987; Welch y Johnson 1999; Fugger, 1999).

La tecnología de sexado espermático, se basa en el empleo del H33342 como un colorante de ADN nuclear, para la selección de los espermatozoides X y los Y por CF. Libbus y colaboradores (1987) plantearon que los colorantes que se unen al ADN podían ocasionar aberraciones en los espermatozoides de mamífero. Johnson (1989) postuló que los fluorocromos podrían reducir la viabilidad embrionaria y las gestaciones a la mitad.

Estudios recientes han empleado espermatozoides teñidos y sin teñir, con la finalidad de observar cambios provocados por la exposición al H33342, no encontrando aberraciones genéticas, ni daños en la integridad del ADN, aunque si fue posible observar mutaciones en la actividad mitótica, a nivel de motilidad espermática, no habiendo ninguna diferencia entre los espermatozoides teñidos y sin teñir (Seidel y Garner, 2002).

Por otro lado el grupo de investigación de Schenk, reportó que la exposición de los espermatozoides a concentraciones de 149 o 224 μM de H33342, no se afectaba la motilidad espermática después de su análisis por CF, cuestión que se complementa al no observarse cambios en el porcentaje de desarrollo de blastocistos producidos por FIV con semen sexado (Schenk, 1999, Zhang *et al.*, 2003).

Johnson y Clarke (1988), observaron que los espermatozoides seleccionados por CF empleando H33342, eran capaces de fertilizar de la misma forma en que sucedía al emplear semen sin sexar, lo cual indica que la replicación del ADN es funcional aún cuando se une al colorante y bajo las condiciones de CF (Johnson, 1998; Johnson, 1999). Existen reportes de pruebas realizadas tanto *in vivo* como *in vitro*, que han dado como resultado la producción de alrededor de 20,000 nacimientos de becerros utilizando semen sexado sin reportarse anomalías debidas al uso de dicho fluorocromo (Seidel, 2003).

Maxwell y colaboradores (Maxwell *et al.*, 2004) reportaron los resultados de un estudio para determinar si el colorante afecta al semen de bovino empleado en la FIV. Compararon muestras teñidas y sin teñir, seleccionadas y no seleccionadas, utilizando semen descongelado de tres sementales y teñido con H33342, seleccionando y separando los espermatozoides X de los Y por CF. Al final de la fertilización se observó una eficiencia de 53.1% de blastocistos producidos con semen teñido no sexado, 59.9% de blastocistos de semen teñido y sexado, y 69.7% de blastocistos de semen no teñido ni sexados.

Syto Green 13

Este colorante pertenece a la familia de los fluorocromos Syto, permite analizar el contenido de ARN y ADN en gran variedad de células incluyendo las somáticas, así como en bacterias gram positivas y negativas, evaluar la extensión de la cromatina condensada dependiendo del grado de exclusión del colorante. El SG 13 es excitable por rayos UV o por luz visible (rayos de argón). Difunde prácticamente en 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 electroforesis en gel (Molecular Probes, 2000).

Hasta la fecha no se han reportado estudios comparativos entre SG 13 y H33342, aunque existe la posibilidad de emplear al primero como una alternativa para su uso en el sexado espermático por medio de la detección de ácidos nucleicos. El único antecedente que se tiene acerca del uso de SG 13 para el análisis de ADN en espermatozoides de toro, fue un estudio preliminar realizado como parte integral de una tesis de licenciatura (Cruz, 2002). Por esta razón, el estudio comparativo de estos fluorocromos en un equipo FACS Vantage que se encuentra disponible en México y que además es de un costo menor al de un MoFlo, podría representar una alternativa en la metodología del sexado espermático en México, el cual no se realiza hasta la fecha. Además, no se han reportado estudios en los cuales el FACS Vantage haya sido empleado con fines de sexado espermático. Este equipo se está empleando principalmente para separar células linfoides.

Técnicas de Reproducción Asistida relacionadas al sexado espermático por CF

Maxwell y colaboradores reportaron la eficiencia del sexado espermático, empleando una combinación de diversas Técnicas de Reproducción Asistida (TRA); presentaciones de semen, concentraciones por dosis, produciendo las primeras crías con esta metodología. Este estudio concluyó que el sexado espermático por CF es una herramienta útil para hacer más eficientes los procesos reproductivos al combinar diferentes técnicas en diversas especies domésticas de interés productivo, como bovinos, ovinos y porcinos (Maxwell y col, 2004).

Transferencia de embriones producidos por FIV

Entre las TRA que se han empleado en combinación con el sexado de semen por CF está la transferencia de embriones bovinos producidos por FIV, que se ha usado con la finalidad de incrementar la utilidad práctica del semen sexado. La combinación de ambas técnicas, de ser efectivas, permitirán el desarrollo de metodologías más eficientes para la producción *in vitro* de embriones, de sexo predeterminado, que puedan ser criopreservados ya sea por cristalización o vitrificación para su futura transferencia. Esto facilitaría la comercialización y aplicación cotidiana de la tecnología de sexado espermático como una herramienta útil para ser empleada en combinación con las TRA (Maxwell *et al.*, 2004).

Fluorescencia por Hibridación *in situ* (FISH)

La FISH es una herramienta que permite reducir el número de espermatozoides dañados por dosis, o dicho en otros términos permite enriquecer las dosis con poblaciones de espermatozoides X o Y, dependiendo de lo que se requiera para obtener embriones por medio de FIV o ICSI. La metodología de FISH ha permitido determinar con un 65% de eficiencia, la identificación de espermatozoides con el cromosoma X y con un 60% de eficiencia los espermatozoides con el cromosoma Y después de ser sexados (Johnson, 1998). Dentro de los avances que se han logrado a nivel internacional, se reporta la importancia de predeterminar el sexo de los espermatozoides a ser empleados en el proceso de ICSI, debido a que este método permite la eliminación de factores no relacionados con los espermatozoides sexados, ya que es un proceso que no requiere de la motilidad espermática, puesto que se inyecta la cabeza del espermatozoide en el óvulo maduro.

Evaluación morfológica o análisis morfométrico

Como una metodología complementaria a la FISH los espermatozoides se pueden someter a una evaluación de parámetros morfológicos o morfométricos, basada en el tamaño de la cabeza, la cual proporciona una eficiencia del 70% en la identificación de los espermatozoides con cromosoma Y, y del 75% para los que tienen cromosoma X. Dicha evaluación se basa en la diferencia de la formación del segmento ecuatorial, creando un pico triangular en la cabeza del espermatozoide con cromosoma X, y un pico secundario pequeño en los espermatozoides con cromosoma Y. Esto pretendía ser en 1998, un método de sexado seguro y efectivo basado en las características geométricas de la cabeza espermática, para su posterior uso en la fertilización por ICSI, proporcionando grandes beneficios a la reproducción (Johnson, 1998).

Técnicas para confirmar la pureza de las poblaciones seleccionadas

Después de la realización del sexado espermático por cualquiera de las vías que se han planteado, todos los métodos terminan en un mismo punto, la confirmación de la pureza de las poblaciones seleccionadas, dentro de los cuales se encuentran:

1. Reanálisis por CF, que consiste en analizar por segunda ocasión las muestras espermáticas recuperadas del CF.
2. PCR, técnica que emplea sondas específicas para el cromosoma Y.
3. FISH, técnica que por sí misma puede ser empleada como un método para el sexado y recuperación de espermatozoides viables.

Todas estas herramientas son útiles para el mejor desempeño del sexado espermático (Johnson *et al*, 1988, Johnson, 1991, Seidel *et al*, 1997, Johnson y Welch, 1999, Welch y Jonson, 1999, Garner, 2001, Seidel y Gerner, 2002, Welch *et al*, 1995, Johnson *et al.*, 1993, Maxwell *et al.*, 2004).

Factores de influyen en el sexado espermático por CF

Se han reconocido varios factores que influyen de forma importante en el sexado espermático por CF:

1. El plasma seminal puede mejorar la viabilidad de los espermatozoides de ovinos, porcinos y bovinos diluidos (Maxwell y Johnson 1999).
2. El proceso de preselección del semen influye en la eficiencia de la separación en CF, su objetivo es eliminar la mayoría de los espermatozoides muertos, inmóviles y anormales, así como contaminantes de las muestras (Fugger, 1999).
3. La selección de las poblaciones espermáticas purificadas y empleadas al momento o bien almacenadas, (congeladas y descongeladas para ser usadas en un futuro), no afecta la capacidad de FIV, permitiendo la combinación del sexado con la transferencia de embriones (TE), como ocurre en el caso de ovinos y bovinos (Johnson, 1999; Seidel, 2002).
4. La centrifugación es parte importante de la manipulación del semen, antes y después del sexado. De no ser empleada de forma adecuada, puede reducir el porcentaje de espermatozoides viables que pueden ser utilizados en otras TRA.
5. La cantidad de espermatozoides requerida por dosis para realizar IA convencional. Al aumentar el número de espermatozoides muertos o dañados se requiere aumentar la concentración por dosis, o bien es necesario reducir al máximo la distancia entre el lugar de depósito de los espermatozoides y el sitio donde se tiene que llevar a cabo la fecundación. Por ejemplo, en cerdos se requiere alrededor de 50 millones por dosis normal, pero si se empleara semen sexado y además congelado la concentración necesaria por dosis se elevaría a 250 millones (Maxwell *et al.*, 2004). En tanto, para realizar IA convencional en bovinos se requiere de 30 millones de espermatozoides por dosis, depositados en el cervix, pero si se emplea semen sexado la concentración por dosis se reduce a solo 2 millones, mismos que tienen que ser depositados en el cuerno

- uterino ipsilateral al lugar de la ovulación (Jacobson, 2002).
6. El número de espermatozoides recuperados viables después del procesamiento del eyaculado para la identificación del sexo por CF es bajo.
 7. El número de espermatozoides viables después de la separación y recuperación espermática es bajo.
 8. La cantidad de espermatozoides que mueren por el proceso de congelación y descongelación de las muestras es alto.
 9. El uso de TRA como FIV o ICSI, en combinación con el sexado espermático es una necesidad, debido a que estas técnicas requieren de una cantidad menor de espermatozoides (1 millón/FIV y 2 millones/IA), a diferencia de las concentraciones requeridas por dosis para llevar a cabo la IA convencional (Maxwell *et al.*, 2004).
 10. Los métodos de separación y manejo de los espermatozoides antes, durante y después de la selección influyen en la capacidad de fertilizar, debido a que los espermatozoides son sometidos a muchos procesos traumáticos, entre estos se incluyen: alta dilución, tinción del núcleo, incubación, además de las fuerzas mecánicas durante su tránsito en el citómetro y la exposición al rayo láser UV.
 11. El empleo de un medio de protección al momento de recuperar a los espermatozoides
 12. Cuidar y controlar: la temperatura, osmolaridad, esterilidad y pH de los medios de colección, criopreservación, los colorantes, además de los tubos en que son procesados los espermatozoides (Maxwell y Johnson, 1999).
 13. Los medios que están en contacto con los espermatozoides antes, durante y después de la CF, han cobrado relevancia debido al papel que desempeñan para la óptima recuperación de espermatozoides sexados viables, por lo cual se han desarrollado diferentes medios en los que son recuperados los espermatozoides después del proceso de sexado.
 - a. Dentro de los primeros medios se encuentra el empleo de PBS como medio de recepción suplementado con 2-20% de yema de huevo

(Johnson, 1995).

- b. En los cerdos se empleó plasma seminal al 1-10% (Johnson, 1995).
- c. En borregos se emplea un medio a base de yema de huevo (Johnson, 1995).
- d. En bovinos se cuenta con diferentes productos comerciales como Androhep, Enduraguard, Talp XY y yema de huevo (Schenk, 1999).
- e. En caballos se emplea un medio a base de glucosa (Buchanan, 2000).

Los medios actuales tienen la finalidad de formar una cama amortiguadora para la recepción del semen; proporcionando cierta protección para reducir el efecto de la dilución y de los daños físicos al momento de entrar al tubo de colección (Maxwell y Johnson, 1999).

Modificaciones que han mejorado la técnica del sexado

Las principales modificaciones que se han hecho a los separadores (también conocidos como sorters) de los citómetros empleados para el sexado espermático son las siguientes:

1. Boquillas modificadas, que tienen la finalidad de lograr que la mayoría de las células que pasan por el rayo láser, lo hagan siempre en el mismo ángulo. Así se disminuye la posibilidad de que los espermatozoides al entrar y pasar frente al láser, lo hagan en ángulos muy diferentes, ya que esto proporcionaría lecturas falsas que dificultarían la diferenciación de espermatozoides con el cromosoma X o el Y (Johnson, 1992).
2. El desarrollo de separadores de mayor rapidez en equipos BD (con la finalidad de obtener dosis de alrededor de 15 millones de espermatozoides X o Y por hora), que puedan ser dirigidos a la producción de crías usando dosis convencionales o más bajas, para la inseminación artificial.
3. La técnica de inseminación intrauterina ha producido lechones y potros al usar bajas concentraciones espermáticas, utilizando 2 millones de espermatozoides por pajilla de 0.25 ml (Johnson, 1988; Johnson, 1991; Johnson, 1995).

4. Se ha observado que de una muestra de semen, solamente el 30% de los espermatozoides pueden ser sexados, el resto sufre cambios durante y después del sexado, los cuales van desde la pérdida de la motilidad hasta la muerte celular.
5. Se ha reportado que el daño espermático más significativo (30%) es ocasionado por una incorrecta orientación de la cabeza del espermatozoide con respecto al láser, lo que da como resultado que el número de espermatozoides viables no supere los 10,000 por segundo. A la fecha los equipos BD separan en promedio 20,000 eventos por segundo (con un rango de 10,000 a 30,000) y los DakoCytomation 40,000 (con un rango de 30,000 a 70,000), por esta razón no se han podido desarrollar equipos que seleccionen a mayor velocidad por el daño que les puede provocar a las células (Seidel y Garner, 2002)
6. Se ha logrado congelar semen, después de ser sexado con éxito, en bovinos, ovinos, caballos, alces, delfines y orcas, permitiendo almacenarlo para ser empleado en otro momento (Jacobson, 2002).

Ventajas del sexado de semen

Las principales ventajas que ofrece el sexado de semen como una herramienta productiva se pueden agrupar englobar de la siguiente manera

Mejoramiento genético:

- 1 Con base en la inseminación de los mejores ejemplares, empleando semen sexado de individuos con calidad genética probada, se logra un avance genético en las crías producidas.
 - i Formar lotes de hembras no seleccionadas para la reproducción para emplearlas como receptoras de embriones de calidad genética superior.
- 2 Aumentar el porcentaje voluntario de desecho de vacas poco productivas (presión de selección), debido a la mayor disponibilidad de vaquillas de reemplazo.

- 3 Probar eficientemente a los toros jóvenes por la preponderancia del número de hijas de su progenie.
- 4 Manejo reproductivo:
 - i La incidencia de partos distócicos en vaquillas disminuye, teniendo en cuenta que el peso al nacer, en la mayoría de los casos es menor en las hembras que en los machos.
- 5 Productividad en la ganadería:
 - i La producción de reemplazos en hatos lecheros se ve favorecida.

Limitantes del sexado espermático

- 1 La vida útil de los espermatozoides en el tracto genital es corta, lo que genera la necesidad de:
 - a Depositar los espermatozoides en porciones más internas del útero. En los bovinos se han empleado dosis de 5 millones de espermatozoides sexados para hacer inseminaciones por una técnica histeroscópica y depositarlos en el útero (Lindsey, 2002).
 - b Reducir el tiempo de espera entre el momento de la ovulación y el tiempo que tardan en encontrarse con el óvulo para llevar a cabo el proceso de la fertilización, después de realizar una inseminación.
 - c Determinar el momento adecuado para la inseminación evitando que sea antes o después de la ovulación (Maxwell *et al.*, 2004).
- 2 Los espermatozoides pueden sufrir daños o cambios relacionados a la capacitación como resultado de la CF, la congelación y descongelación del semen sexado, afectando los porcentajes de fertilización y por ende de gestación en las especies en las cuales se ha empleado (Johnson, 1999; Seidel, 2002).
- 3 El sistema de sexado por medio de CF patentado por Johnson en 1989 disminuye un 20% el porcentaje de preñez, posiblemente debido al estrés y el daño al que se someten las células al pasar por el citómetro (Seidel, 2002).

- 4 La separación de espermatozoides de un sexo determinado con un rango mínimo de 90% de pureza, implica una separación a una velocidad lenta, lo que hasta el momento disminuye la rentabilidad del método (Seidel, 2002).
- 5 Otra limitante es que los citómetros empleados para realizar el sexado de semen tienen costos elevados que están en el orden de los 300 mil dólares y se requieren varios para trabajar en una escala comercial (Jacobson, 2002).
- 6 El precio a pagar por una pajilla de semen sexado debe de ser más elevado del que se paga por el semen comercial no sexado.

Aplicaciones del sexado espermático

Johnson y colaboradores desarrollaron la tecnología Beltsville (Johnson, 1989) para el sexado espermático por CF, la cual fue patentada para su uso comercial ofreciendo ventajas en el mejoramiento genético en mamíferos, contribuir a controlar enfermedades de transmisión sexual en humanos y mejorar las estrategias de manejo de fauna silvestre en cautiverio para su repoblación, al seleccionar solo a los mejores ejemplares para someter sus espermatozoides al proceso de sexado (Johnson 1988).

Relevancia económica del uso del semen sexado

En la actualidad, en el Reino Unido, en los EEUU, el semen sexado se encuentra en plena comercialización. En Argentina, Brasil y en México, se encuentra en etapa de pre-comercialización. Las compañías productoras de semen sexado todavía están estudiando las formas en que se promoverá el producto, por ejemplo: si venden el semen fresco, congelado o de ambas formas; lo cual determinará el número de espermatozoides por dosis y que clase de toros se emplearán, entre otras. Además están intentando determinar el precio óptimo para cada dosis, esta decisión dependerá de la percepción del mercado (Zhang *et al.*, 2003).

Finalmente, suponiendo que la calidad genética del semen sexado y no sexado sea similar, hay variaciones en los precios de venta en diferentes países. En EEUU el precio de venta es de 30 a 50 dólares (Zhang *et al.*, 2003, Comunicación personal: Sr. Juan F. Moreno, Sexing Technologies). En México se ha comenzado a comercializar cada dosis en 25 dólares, siendo estos precios competitivos con el semen no sexado, por lo que muchos ganaderos están dispuestos a pagar hasta 30 dólares por dosis de semen sexado (Jacobson, 2002; Comunicación personal: Dr. Armando Barba).

Ha sido difícil para muchas compañías de procesamiento de semen concretar las negociaciones con los dueños de los derechos intelectuales, así como también examinar y evaluar el potencial de mercado para determinar un precio apropiado por la tecnología. Por ejemplo, en los EEUU ya existen contratos que debe firmar cada comprador de semen y que le permiten usar el semen que ha comprado bajo ciertas condiciones (por ej IA, FIV), pero que le prohíben usarlo con fines diferentes a los establecidos en su contrato (si se compra para uso en IA, no se permite usarlo en FIV) (Zhang *et al.*, 2003; Comunicación personal: Sr. Juan F. Moreno, Sexing Technologies y Dr. Salvador Romo).

Las estrategias de mercadotecnia no deben ser sólo evaluadas por la capacidad que tengan de proveer semen, sino que también es necesario tomar en cuenta el costo de la instalación de un equipo para CF. Esto sin olvidar aspectos como la capacitación del personal, las necesidades de mantenimiento del equipo, el costo de la propiedad intelectual, que debe incluir el pago de cuotas por la licencia para el manejo del equipo, licencia para el manejo de la metodología y las regalías por el semen vendido. Si se toman en cuenta estos factores, probablemente se pueda garantizar la producción de un volumen determinado de dosis de semen. Pero estas cuotas deben estar basadas en la percepción del mercado. Haciendo una estimación de costos se puede hablar que por concepto de operación y capacitación del personal al año posiblemente se inviertan aproximadamente \$2 millones de dólares. Por otra parte, si se toma en cuenta la comisión por venta de las dosis de semen sexado, aumentaría el costo de unos

\$10 a 50 dólares, lo cual hace que el precio final de una dosis pueda llegar a ser desde \$100 hasta \$300 dólares.

Estos gastos plantean la posibilidad de un costo demasiado elevado para el consumidor final, quien a pesar de tener interés por obtener semen de este tipo no se encontraría dispuesto a pagar dosis demasiado costosas, por lo cual uno de los principales puntos a analizar es el precio de venta (Zhang *et al.*, 2003).

III HIPOTESIS

La tinción del ADN de los espermatozoides bovinos con SG13 permitirá obtener una fluorescencia diferencial de las sub-poblaciones espermáticas "X" y "Y" por medio de CF y en consecuencia será posible realizar la recuperación de espermatozoides sexados y viables. Esto permitiría utilizar al SG13 como un método alternativo al H33342.

El Citómetro FACS Vantage permitirá un análisis del ADN espermático en bovinos (incluyendo sexado, selección, separación y recuperación), en forma igual al que se realiza con el Citómetro MoFlo. Esto permitiría utilizar un equipo ya existente en México, evitándose la adquisición e importación de aparatos más costosos para el sexado espermático por CF.

IV JUSTIFICACION

Hasta el momento, el proceso basado en la CF para el sexado espermático es el más estudiado aunque, la asimetría de los espermatozoides dificulta la separación de las sub-poblaciones espermáticas. Sin embargo, se están realizando investigaciones con la finalidad de encontrar una metodología óptima para el sexado espermático por medio de CF, que pueda ser empleada con fines comerciales a gran escala y a un costo accesible. La CF como método de sexado espermático no se ha definido con claridad como herramienta de uso cotidiano, debido a las desventajas que implica. Sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento sobre esta área con recursos disponibles en México, y de conseguirse resultados favorables podrían ser de aplicación inmediata en el ámbito de trabajo de nuestro país y a nivel de campo (Cruz, 2002).

El presente trabajo plantea el uso de un citómetro FACS Vantage y del colorante SG13 con la finalidad de evaluar y determinar la diferencia del contenido de ADN entre las sub-poblaciones espermáticas, para recuperar espermatozoides sexados y viables. A la fecha no se ha reportado el uso de este citómetro ni del colorante SG13 para realizar el sexado espermático.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar una metodología alternativa al sexado espermático comercial mediante el empleo de un equipo FACS Vantage y dos colorantes (H33342 y SG13), por medio de CF con la cuantificación de ADN en semen congelado-descongelado de bovino que permita recuperar las sub-poblaciones X y Y.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Realizar la calibración del equipo por medio del empleo del marcaje de ADN de espermatozoides de toro con los dos colorantes vitales seleccionados (SG13 y H33342), necesario para localizar las regiones correspondientes a las dos sub-poblaciones espermáticas susceptibles a ser seleccionadas y recuperadas.
2. Determinar la eficiencia del sexado espermático evaluando los siguientes parámetros: motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos tras el proceso; grado de pureza de las poblaciones, por medio de un segundo análisis de sexado por CF y viabilidad de las poblaciones mediante la técnica de tinción de frotis con Eosina-Nigrosina.
3. Realizar un estudio comparativo tiñendo con H33342 el ADN de espermatozoides comercialmente sexados y congelados, para emplearlos como control de la correcta localización de la población de espermatozoides Y, evaluando su motilidad y viabilidad tras el proceso de sexado.

VI MATERIAL Y METODOS

Lugar y fechas

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Citometría de Flujo, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Zacatenco, del Instituto Politécnico Nacional, en la Ciudad de México, durante el periodo comprendido entre Abril y Noviembre de 2004.

Preparación de reactivos y soluciones

Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS)

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

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

En agitación constante, incorporar las sales al agua en el orden en que se presentan, esperar a que se disuelva cada una de las mismas antes de incorporar la siguiente. Ajustar el pH a 7.4 antes de aforar la solución. Filtrar con una membrana de 0.2 µm y mantenerla en refrigeración.

Solución amortiguadora TNE

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

TRIS (Sigma)	1.2114 gr
NaCl (Sigma)	8.766 gr
EDTA (Sigma)	0.2922 gr

Las sales se incorporan al agua en el orden en que se presentan, esperando que se diluyan cada una de ellas antes de incorporar la siguiente, todo esto en agitación constante. Ajustar el pH a 7.4. Aforar al volumen requerido, filtrar con una membrana de 0.22 μm y mantener a temperatura ambiente.

Fluorocromos

Preparación del H33342

Se prepara una solución stock a una concentración 10mg/ml, se pesan 10 mg de H33342 en polvo (Sigma, presentación en polvo,) y se diluyen en 1 ml de agua desionizada. Todo el procedimiento (pesaje, dilución y conservación) se realiza en oscuridad, y se conserva en congelación.

Preparación del SG13

El SG13 (Molecular Probes, presentación líquida a una concentración de 5mM) no requiere preparación pues su presentación comercial es líquida. Se adicionan directamente 0.2 μl a las muestras que se procesaran con este fluorocromo. Se conserva en refrigeración antes y después de su uso.

Procedimiento

El trabajo constó de 6 grupos, los primeros 5 grupos tuvieron por finalidad estandarizar la metodología para analizar, separar y recuperar las poblaciones espermáticas empleando dos fluorocromos, además de evaluar la viabilidad de los espermatozoides después de ser sometidos al proceso de sexado y el sexto grupo correspondió a un grupo control en el cual las muestras empleadas fueron dos dosis de semen comercialmente sexado que sirvieron para corroborar la correcta localización de la sub-población Y.

Procesamiento de las muestras

Para la utilización de las muestras se procedió a descongelar las pajillas de semen en baño María a una temperatura de 35°C por 45 segundos para su lavado. Una vez descongeladas las muestras se procedió a resuspender el contenido de las mismas en 1 ml de PBS para de ahí tomar una gota de 20 μ l que se colocó en un portaobjetos para evaluar la movilidad y porcentaje de viabilidad de los espermatozoides contenidos en cada una de las muestras en un microscopio óptico a un aumento de 40X.

Lavado de las muestras

Las muestras fueron colocadas en tubos de centrifuga de 15 ml, adicionados con 5 ml de TNE y resuspendiendo por agitación suave. Inmediatamente después fueron centrifugados a una velocidad de 1500 rpm (250 g) por 5 minutos, 3 muestras de cada grupo a temperatura ambiente y las demás muestras a 37°C. El sobrenadante fue eliminado y el botón celular fue resuspendido nuevamente en 5 ml de TNE. Se repitieron dos ocasiones más los ciclos de centrifugación y al final de dicho proceso se resuspendió el botón en 1 ml de PBS.

Una vez realizado el lavado se tomó una muestra de 20 μ l y se evaluó al microscopio la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, en frotis teñidos con eosina-nigrosina.

Técnicas de tinción

Las pajillas cuentan con un volumen de 0.5ml que fueron llevados a un volumen de 1 ml después de ser sometidos al proceso de lavado, éstas fueron repartidas de la siguiente manera en los distintos grupos experimentales:

Grupo1. Tinción con SG13

Se emplearon 15 pajillas de semen congelado-descongelado no sexado, de 0.5ml cada una, de toros de raza Simental y Brahaman teñidas con SG13.

Las muestras fueron colocadas en tubos de citometría de 6 ml adicionado con un volumen de 0.2 μ l de SG13 (10 mM), homogeneizando suavemente las muestras, las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente y en completa oscuridad por 10 minutos. Una vez realizada la tinción se procedió a analizar las muestras por CF.

Se buscó ampliar de 30 a 45 minutos el tiempo de incubación para la fijación del colorante debido a que se planteó la posibilidad de que tal vez por falta de tiempo era que el SG13 no permitía una separación adecuada de las poblaciones que serían recuperadas.

Grupo 2. Tinción con H33342

Se emplearon 15 pajillas de semen congelado-descongelado no sexado, de 0.5ml cada una, de toros de raza Simental y Brahaman.

Las muestras fueron colocadas en tubos de citometría de 6ml, a los cuales se adicionaron 4 μ l de H33342 (10 mM). Se procedió a homogeneizar suavemente la muestra y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 5 minutos. Una vez realizada la tinción se procedió a analizar las muestras por CF.

Grupo 3. Doble tinción con H33342 y SG13

Se emplearon 15 pajillas de semen congelado-descongelado no sexado, de 0.5ml, de toros de raza Simental y Brahaman, teñidas con una combinación de SG13 y H33342.

La formación de este grupo se debió a los cambios presentados en la velocidad de penetración y a la pérdida de la fluorescencia de ambos fluorocromos, por ello se realizó una doble tinción empleando tanto SG13 como H33342, para evaluar la localización de las poblaciones con los dos colorantes.

Las muestras fueron colocadas en tubos de citometría, a los cuales se adicionó un volumen de 0.2 μ l de SG13 y 4 μ l de H33342. Se procedió a homogeneizar suavemente la muestra y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 5 minutos. Una vez realizada la tinción se procedió a analizarlas por CF y se recuperaron las poblaciones en tubos de fondo redondo.

Grupo 4. Tinción de espermatozoides muertos con SG13

Con el objetivo de valorar el funcionamiento del SG13 como colorante vital, se empleó con células muertas y por ende con la membrana permeable.

Para este ensayo se utilizaron pajillas con espermatozoides muertos de semen congelado-descongelado no sexado, de 0.5ml cada una, de toros de raza Simental y Brahaman, teñidas con SG13. 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

Las muestras fueron colocadas en tubos de citometría, en los cuales se adicionó un volumen de 0.2 μ l de SG13 Se procedió a homogeneizar suavemente la muestra y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 minutos. Una vez realizada la tinción se procedió a analizarlas por CF.

Se probó el Medio Sperm para brindar un ambiente más favorable a los espermatozoides al momento de ser recuperados tras su selección por medio de CF.

Grupo 5. Tinción de espermatozoides con H33342 controlando la temperatura

Se utilizaron 15 muestras de semen congelado-descongelado no sexado, contenido en pajillas de 0.5ml, de toros de raza Simental y Brahaman.

Con la finalidad de obtener resultados homogéneos, se realizó el presente grupo para controlar las principales variables que fueron la temperatura de las muestras durante la incubación, de los medios de tránsito, los tiempos de incubación y cambiando el medio de recuperación que hasta el momento había sido PBS. Éste último se sustituyó por medio Sperm (Sigma No de catalogo bss-044-f-20deg) medio menos hostil para los espermatozoides que fueron separados.

El procesamiento de las muestras fue de la siguiente manera, los espermatozoides fueron colocados en tubos de citometría, a los cuales se adicionó un volumen de 2 μ l de H33342. Se resuspendieron suavemente y se incubaron a 37°C en oscuridad por 5 minutos. Una vez realizada la tinción se procedió a analizar las muestras por CF, controlando la temperatura de los medios de tránsito manteniéndolos siempre a la misma temperatura de 37°C.

Se modificaron los siguientes factores para tener un mayor control del proceso. Se probaron dos medios de lavado TNE y PBS. Se modificaron la velocidad y el tiempo de centrifugación para eliminar el medio de congelación esto con la finalidad de disminuir el daño celular. Se controló la temperatura de la centrifuga manteniéndola por arriba de los 25°C debido a que en el trabajo anterior se manejó una temperatura ambiente, pero por las condiciones medio ambientales que se presentaron en los días en que realizaron los experimentos, la temperatura ambiente se encontraba por debajo de los 18°C. Se buscó reducir de 30 a 0 minutos el tiempo de incubación para la fijación del fluorocromo, debido a que se planteó la posibilidad de una penetración acelerada debido a los medios en los cuales fueron conservados los espermatozoides y que tal vez por esa razón, no se obtenía una separación adecuada de las poblaciones. Se redujo el tiempo entre la separación-recuperación de las poblaciones y la evaluación de la integridad y

motilidad post-selección espermática. Se controló la temperatura de los medios de lavado y de tránsito, manteniéndola a 37°C durante todo el proceso. Se probó el Medio Sperm para brindar un ambiente más favorable a los espermatozoides al momento de ser recuperados tras su selección por medio de CF.

Grupo 6. Tinción de espermatozoides (sexados comercialmente) con H33342

Para formar el grupo control y determinar los parámetros de las sub-población Y se emplearon 2 muestras de semen comercialmente sexado, teñidas con H33342.

Se realizó el marcaje del ADN de espermatozoides Y procedentes de pajillas sexadas comercialmente, después de ser lavados de la misma forma en que se procesaron las muestras empleadas anteriormente. Los espermatozoides fueron colocados en tubos de citometría, se les adicionó un volumen de 2 µl de H33342. Se procedió a homogeneizar suavemente la muestra y se incubó a 37°C y en oscuridad por 5 minutos. Una vez realizada la tinción se procedió a analizarlas por CF, determinando la región correspondiente a la sub-población de espermatozoides Y.

Prueba de viabilidad después del sexado por CF

El total de las 67 muestras analizadas en el FACS Vantage, fueron evaluadas por medio de frotis teñidos con eosina-nigrosina después del análisis, separación y recuperación espermática, para determinar la viabilidad de los espermatozoides después de ser sometidos a la CF.

Calibración del Citómetro FACS Vantage

Antes de utilizar el equipo para realizar el sexado de espermatozoides bovinos, el citómetro fue calibrado, determinando los parámetros que se utilizan en las muestras de semen a procesar.

Se ajustó la marca del histograma al determinar el fluorocromo a utilizar como marcador de fluorescencia, la corriente en flujo, se fijó la distancia del láser al inyector y se ajustó la velocidad de flujo, maximizando la señal de la granularidad de las células analizadas en el canal FSC, la señal del canal de fluorescencia FL1 que es empleado para detectar la auto fluorescencia de las muestras, esencial para que le permitan detectar el ADN en las células espermáticas.

Para cada muestra de semen congelado-descongelado se empleó una velocidad promedio de 20 mil eventos por segundo, analizando los 100 mil primeros y recuperando todas las células de cada muestra, en el caso de las muestras de semen comercialmente sexado se aumento la velocidad a 30 mil eventos por segundo debido a que correspondía a un población pura de espermatozoides Y.

Segundo análisis (reanálisis), por CF de las poblaciones recuperadas

En todos los grupos experimentales, después de la localización, separación y recuperación de las poblaciones se procedió a realizar un segundo análisis para evaluar el grado de pureza de cada una de las muestras recuperadas. Esto permitió observar tanto el grado de contaminación por parte de la otra población (contaminación de la población X con espermatozoides de la población Y, y viceversa), como la posibilidad de ver la disminución de fluorescencia y el porcentaje de espermatozoides dañados por el procedimiento (observando el grado de células rotas o de células aglomeradas que provoca la observación de una tercera población o pico, localizado en una posición diferente a las correspondientes a las dos sub-poblaciones espermáticas).

Evaluación de las poblaciones recuperadas

Los parámetros evaluados fueron la motilidad y viabilidad para ello se realizaron los siguientes procesos:

1. Se tomaron 20 μ l de la población seleccionada, sexada y recuperada, para

observar al microscopio la motilidad espermática.

2. Se tomaron 20 μl de la misma muestra para realizar un frotis y teñirlo con Eosina-Nigrosina, para evaluar la viabilidad espermática, después de realizar el sexado espermático.

Con la finalidad de obtener muestras más concentradas para emplearlas en la realización de los frotis antes mencionados, los tubos de recuperación fueron centrifugados y de ahí se tomaron las dos gotas de 20 μl , para llevar a cabo el mismo procedimiento que con las muestras procesadas inmediatamente después de ser recuperadas.

Análisis Estadístico

Debido a que no fue posible observar los mismos resultados entre todos los diferentes grupos experimentales, lo cual es posible al observar que presentaron distintas formas de dispersión de las poblaciones, la evaluación estadística solo fue efectuada de forma individual en cada una de las muestras de los diferentes grupos experimentales, en los cuales se evaluó el grado de separación, diferenciación y recuperación de las sub-poblaciones espermáticas que corresponden a la población que contenía los espermatozoides con cromosoma X o con el cromosoma Y. Las evaluaciones estadísticas son el resultado del conteo celular correspondiente a las 100 000 células analizadas antes de la recuperación, la cual realiza el citómetro para la elaboración correspondiente de cada uno de los diagramas de dispersión de puntos donde son observadas las poblaciones espermáticas y de los histogramas donde la fluorescencia emitida por el fluorocromo se confronta con la complejidad de las células. Esto permite observar

las regiones correspondientes a las sub-poblaciones espermáticas de cada una de las muestras analizadas.

Los programas de computo (software) que se utilizaron fueron:

- **CellQuest.** Para adquirir y analizar las muestras en el CF
- **WinMDI.** Para realizar el análisis de los resultados de cada una de las muestras procesadas.

V. RESULTADOS

Grupo 1. Muestras teñidas con SG13

En este grupo los espermatozoides vivos al ser analizados mostraron un patrón de fluorescencia en forma de cometa, característico de células maltratadas (Figura 1) lo que permitió observar el traslape de las sub-poblaciones espermáticas ocasionado por la dificultad que presentó el equipo para la clara identificación de las poblaciones teñidas con SG13, esto es debido a que no se pudo diferenciar la fluorescencia emitida por las células teñidas. Por esto, no fue posible observar de forma clara las regiones correspondientes a las dos sub-poblaciones espermáticas (Figura 1); característica que se hizo evidente al realizar el histograma de dispersión de puntos que sirvió para evidenciar la dificultad de separación y recuperación de las poblaciones (Figura 2). Las gráficas presentadas en las Figuras 1 y 2, permitieron localizar las sub-poblaciones y descartar a los agregados identificados en una región con mayor intensidad de fluorescencia.

Después de realizar el sexado a las muestras, para evaluar la viabilidad de los espermatozoides, se tomaron fotografías en las cuales fue posible observar a los espermatozoides vivos de la población Y de color blanco debido a la integridad de la membrana, la cual impidió la penetración de la eosina, en tanto los espermatozoides muertos por presentar una membrana permeable se observan de color violeta, y hubo espermatozoides que no presentan motilidad, pero estuvieron vivos (Fotografía 1).

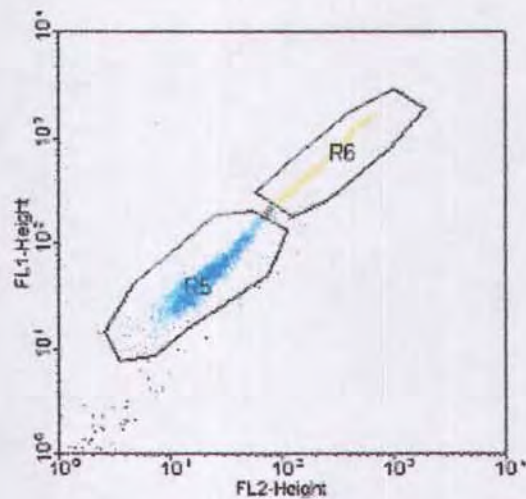


Figura 1. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la muestra analizada, de acuerdo a la altura de la fluorescencia emitida en dos canales de fluorescencia (FL2H vs FL1H respectivamente). Se observan dos poblaciones, una de células maltratadas, que corresponde a la región R5 y una de células con ADN íntegro, localizada en la región R6 que incluyen a las dos sub-poblaciones espermáticas. Esta figura corresponde a el efecto cometa, lo cual dificulta la separación de las poblaciones.

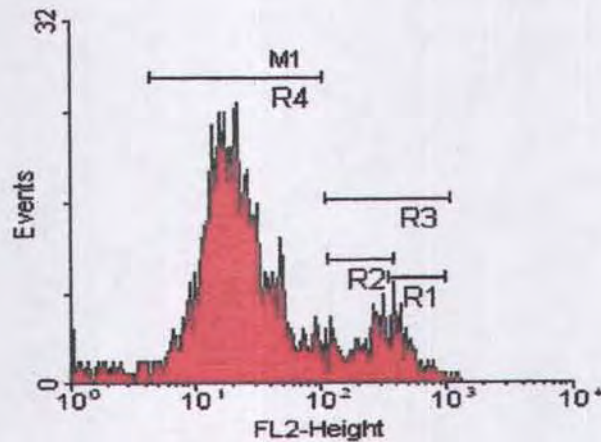


Figura 2. Histograma que analizó una muestra teñida con SG13. La región R3 corresponde a dos sub-poblaciones de espermatozoides íntegros muy cercanas entre si, dificultando la separación (R1 región de espermatozoides con cromosoma X, y R2 espermatozoides con cromosoma Y). La región R4 corresponde a las células maltratadas.



Fotografía 1. Población de espermatozoides con cromosoma Y, recuperada tras ser procesada con SG 13. La mayoría de los espermatozoides están vivos

Grupo 2. Muestras teñidas con H33342

Después de llevar a cabo las pruebas en el grupo 1, en las cuales no se pudo demostrar la eficiencia del SG13 como colorante alternativo para la realización del sexado, el empleo del H33342 para la separación de las poblaciones espermáticas por CF. El uso del H33342 facilitó la localización de las sub-poblaciones de espermatozoides. A diferencia de lo que ocurrió con los espermatozoides teñidos con SG13, las muestras teñidas con H33342 mostraron una separación evidente, como se observa en la Figura 3, no hubo aglomerado celular en la localización de las dos sub-poblaciones. Esto permitió que en el histograma no se presentara un tercer pico desplazado a la derecha de las dos sub-poblaciones espermáticas (Figura 4). Aunque los datos obtenidos en el diagrama de la figura 3 permitieron la elaboración del histograma correspondiente, tampoco fue posible realizar la correcta determinación de las sub-poblaciones espermáticas. Las poblaciones seleccionadas y recuperadas en su mayoría fueron viables (Fotografía 2), pero tampoco presentaron motilidad.

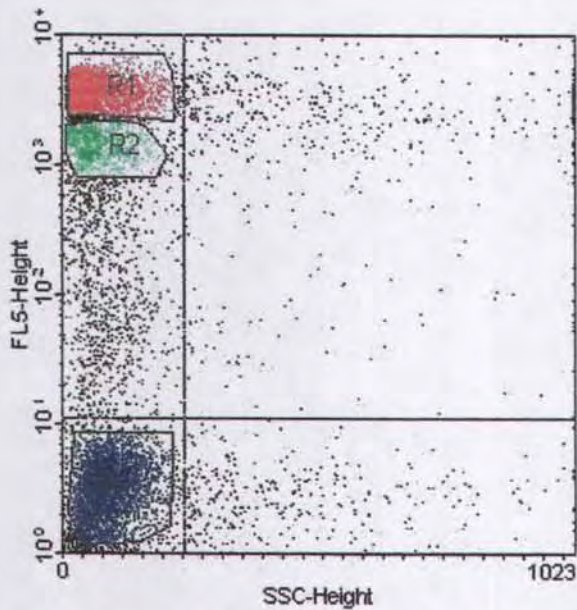


Figura 3. Gráfica de dispersión de puntos donde es posible observar las dos poblaciones espermáticas teñidas con H33342. La Región R1 corresponde a los espermatozoides con el cromosoma X y en la Región R2 a los espermatozoides con el cromosoma Y; en la región R3 se ubicaron las células dañadas.

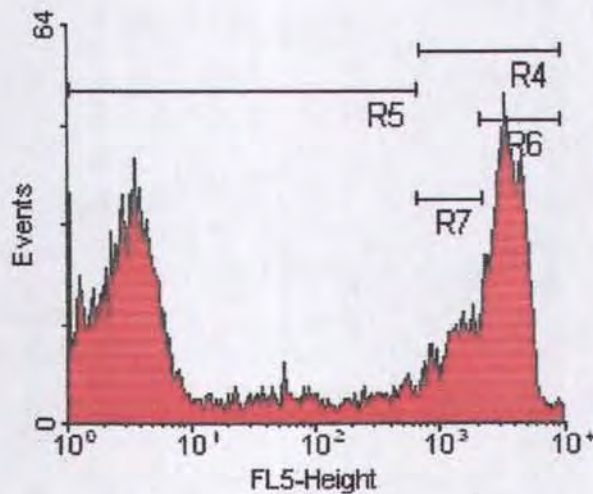
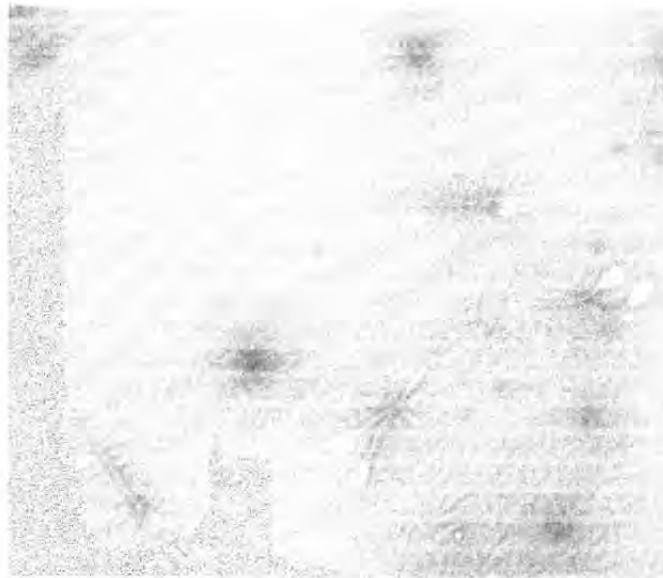


Figura 4 Histograma en donde se localizaron las sub-poblaciones espermáticas teñidas con H33342. Es posible observar dos picos que corresponden posiblemente a despoblaciones celulares. La Región R6 corresponde a los espermatozoides X, la R7 a los espermatozoides Y; la región R5 corresponde a las células maltratadas. No fue posible la separación de las dos poblaciones.



Fotografía 2 Espermatozoides Y recuperados en su mayoría vivos, teñidos con H33342. Las cabezas espermáticas teñidas de color morado corresponden a espermatozoides muertos, que al presentar una membrana maltratada permiten la penetración del colorante. Los espermatozoides vivos y con una membrana íntegra no permiten la penetración del colorante y sus cabezas se observan de color blanco.

Grupo 3. Muestras con doble tinción: H33342 y SG 13

Debido a que las muestras procesadas en los grupos uno y dos no permitieron la estandarización de la técnica de sexado, debido a que no fue posible observar las sub-poblaciones espermáticas, se decidió formar un tercer grupo experimental en el cual se realizaron dos cambios importantes:

1.-Se optó por probar dos medios de lavado de semen (lavar una muestra con PBS y otra con TNE). Los resultados mostraron que al ser lavadas con PBS las células fueron dañadas en forma severa, ya que disminuyó el número de espermatozoides con motilidad, después del proceso de centrifugación. En cambio en el medio TNE las muestras no sufrieron daño.

2.-Las muestras del presente grupo experimental fueron sometidas a un proceso de doble tinción con H33342 y SG13, con el objeto de observar en que canales de fluorescencia era factible observar las sub-poblaciones espermáticas.

Esto dio como resultado el desplazamiento de ambas poblaciones hacia la derecha (Figura 5). Al elaborar el histograma (Figura 6), se observó una clara diferenciación de las sub-poblaciones espermáticas. Estos resultados muestran que al emplear los dos colorantes es posible observar la predominancia del H33342 sobre el SG13, al desarrollarse un patrón similar al observado al emplear solo el H33342. Sin embargo, se presentó una pérdida acelerada de la fluorescencia (después de localizar las regiones delimitadas claramente conforme avanzó el tiempo de análisis y recuperación celular, éstas se fueron acercando observándose como un barrido celular donde no fue posible observar la delimitación de las sub-poblaciones). Con los espermatozoides recuperados de cada una de las muestras analizadas se realizaron frotis donde se observó que con la disminución de tiempos de incubación (se tomó una muestra antes de terminar la recuperación total de las dosis analizadas) y manteniendo la temperatura de 37°C de forma constante durante todo el proceso fue posible obtener un mayor número de células vivas, así como disminuir el daño celular (Fotografía 3).

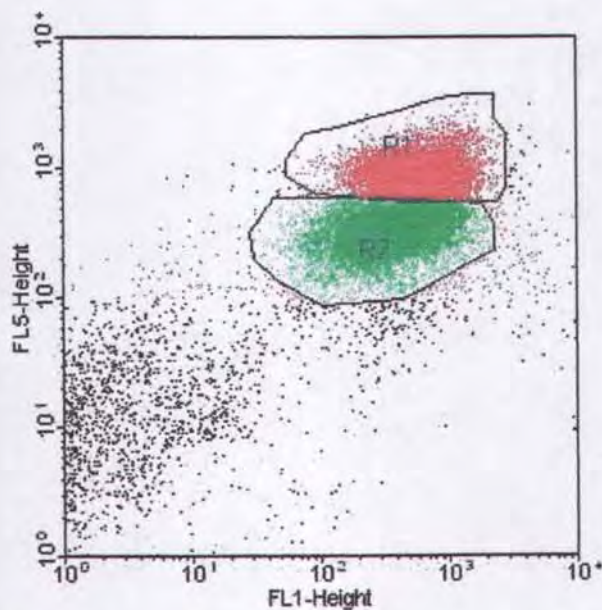


Figura 5. Gráfica de dispersión de puntos donde es posible observar las dos poblaciones espermáticas teñidas con SG13 y H33342, la región R1 con espermatozoides con el cromosoma X y la Región R2 de espermatozoides con el cromosoma Y).

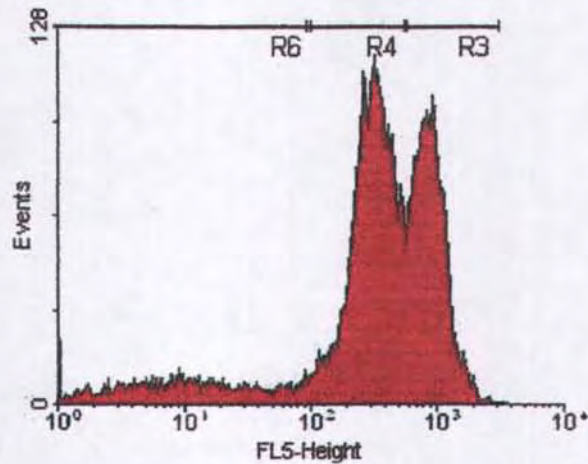


Figura 6. Histograma en donde se localizan las regiones de los espermatozoides teñidos con SG13 y H33342. Se observa la presencia de dos picos los espermatozoides Y en la región R4 y los espermatozoides con el cromosoma X en la región R3. Fue posible observar un tercer grupo, cercano al origen de la gráfica que corresponde a los espermatozoides dañados



Fotografía 3. Se observó en este grupo un mayor número de espermatozoides vivos y una disminución en la cantidad de muertos y dañados como resultado de la disminución de tiempos y temperatura constante durante el proceso,

Grupo 4. Muestras de espermatozoides muertos, teñidos con SG13

Al procesar y teñir espermatozoides muertos con SG13, la penetración de éste fue mayor y permitió una clara separación de dos poblaciones. Sin embargo, se presentó un comportamiento extraño, debido a que fue posible observar las poblaciones espermáticas en el canal de fluorescencia típico para el H33342 (Figura 7). Esto fue más notorio en el histograma (Figura 8) en el cual se observaron dos picos, uno debido a las sub-poblaciones espermáticas y el otro a células dañadas o núcleos aglomerados. Sin embargo debido a la ubicación de ambos picos, parecerían corresponder a células teñidas formando un grupo o pico, y el otro formado por células agregadas o sobre-teñidas.

Con las células recuperadas se realizaron frotis, en los cuales fue evidente la penetración de la eosina-nigrosina y la forma en que se aglomeran las células después de ser recuperadas (Fotografía 4).

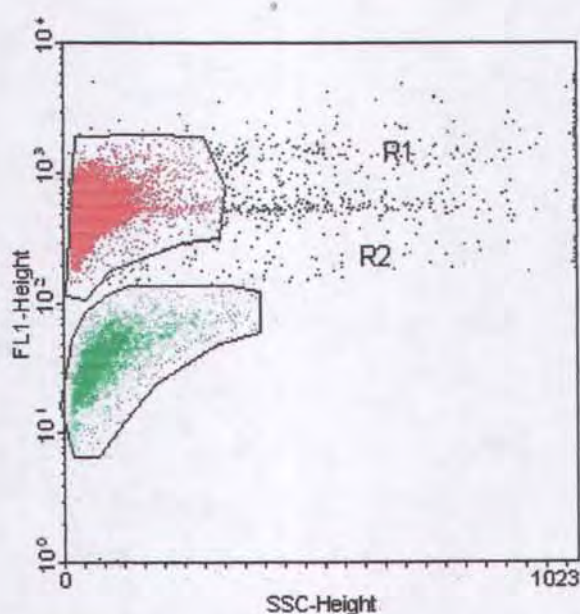


Figura 7 Gráfica de dispersión de puntos donde se localizan las regiones de los espermatozoides muertos teñidos con SG13, en la región R1 los espermatozoides sobre-teñidos, debido a una degradación de la membrana y del ADN espermático y en la región R2 las dos sub-poblaciones espermáticas unidas

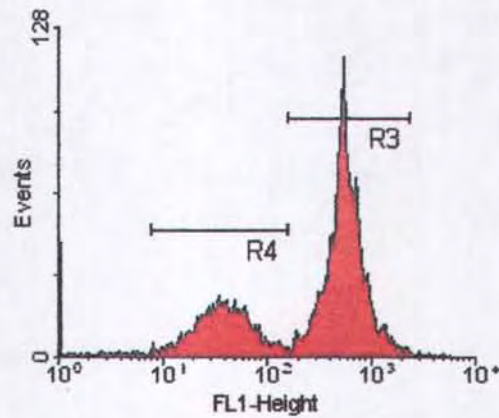
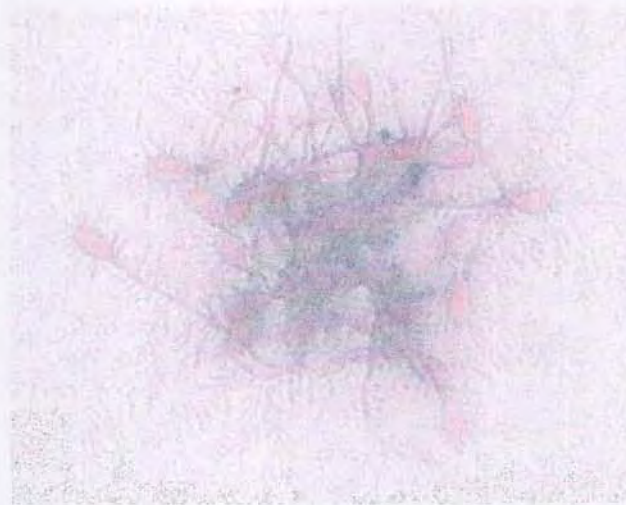


Figura 8 Histograma de donde se fueron analizados los espermatozoides muertos teñidos con SG13 observando dos picos. El primero localizado en la región R3, que corresponde a los espermatozoides dañados que están sobre-teñidos. El segundo pico, localizado en la región R4, donde se localizaron las dos sub-poblaciones espermáticas estrechamente unidas, lo que imposibilitó la identificación y la separación.



Fotografía 4 Muestra de espermatozoides muertos teñidos con SG13 los cuales presentaron una alta penetración de la eosina en las cabezas, observándose de color morado.

Grupo 5. Muestras teñidas con H33342 manteniendo la temperatura en 37°C

A pesar de emplear muestras del mismo toro y de ser procesadas de la misma forma, a lo largo del trabajo experimental, todos los grupos mostraron resultados diferentes, mostrando patrones de distribución de las poblaciones muy diversos. Por este motivo fue necesario plantear este grupo en el cual se controlaron las siguientes variables:

1.- La temperatura de todos los medios que se encontraban en contacto con los espermatozoides sometidos al proceso de sexado.

2.- Se disminuyó el tiempo de incubación de 10 minutos a 5 minutos, para evitar que el fluorocromo provocara una aglomeración celular, detectada por la presencia de una distribución en forma de cometa o la presencia de una sola población, dificultando la separación adecuada de las dos sub-poblaciones. Cuando el periodo de incubación fue corto, se observaron las dos sub-poblaciones claramente definidas (Figura 9) lo cual es favorable para la correcta identificación de las regiones espermáticas que fueron seleccionadas en los histogramas para la recuperación celular (Figura 12)

El realizar el segundo análisis o reanálisis de las poblaciones recuperadas tuvo la finalidad de verificar su grado de pureza, se observó un fenómeno peculiar, que consistió en una elevada contaminación de la población X con la presencia de muchos espermatozoides Y, además de la presencia de células maltratadas localizadas en la parte inferior de la gráfica de dispersión de puntos (Figura 10). Esto se hizo más evidente al momento de realizar un histograma en el cual se muestran dos picos o poblaciones, al igual que en los espermatozoides sin sexar (Figura 13). En cambio en el segundo análisis de la población de espermatozoides Y, el grado de contaminación y daño fue mínimo (Figura 11), y al realizar el histograma de dicha muestra, se observó un solo pico que corresponde a los espermatozoides Y, similar a la que se ha reportado en la literatura (Figura 14).

De las muestras teñidas con H33342 en el grupo experimental se tomó una como ejemplo del comportamiento esperado de las poblaciones sometidas al sexado. De forma igual al resto de las muestras de este grupo, resultando una dispersión típica de dos poblaciones espermáticas (Figura 15) y la presencia de solo dos picos correspondientes a esas dos poblaciones en el histograma (Figura 16). Los resultados no pudieron ser repetidos aunque las condiciones de manejo de las muestras fue el mismo, esto puede ser atribuido a que no se sabe si las dosis de semen con las que se trabajó correspondían al mismo eyaculado, si se procesaron de la misma manera para ser congelados, o si los medio en los cuales fueron criopreservados fueron del mismo lote, factores que no pudieron ser controlados.

Al realizar los frotis correspondientes a estas muestras, se pudo observar que al usar medio Sperm como medio de recuperación y disminuyendo los tiempos de manejo de las muestras, aumentó el número de espermatozoides vivos por muestra, a diferencia de lo que ocurrió al recuperar las sub-poblaciones espermáticas en PBS (Fotografías 5 y 6).

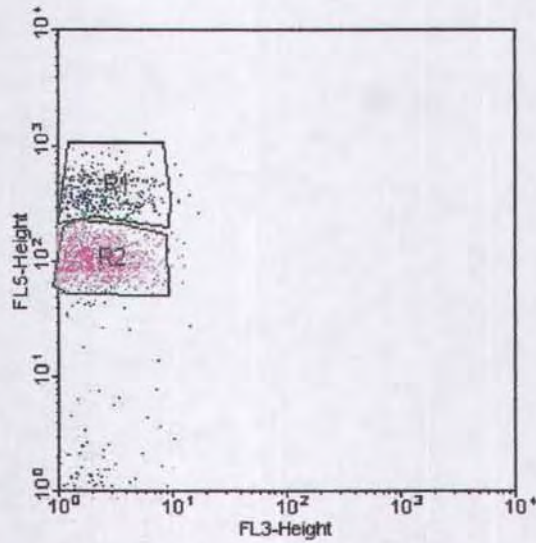


Figura 9. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides teñidos con H33342 sin periodo de incubación, es posible notar la presencia de dos sub-poblaciones. Los espermatozoides X, en la región R1 y los Y en la región R2

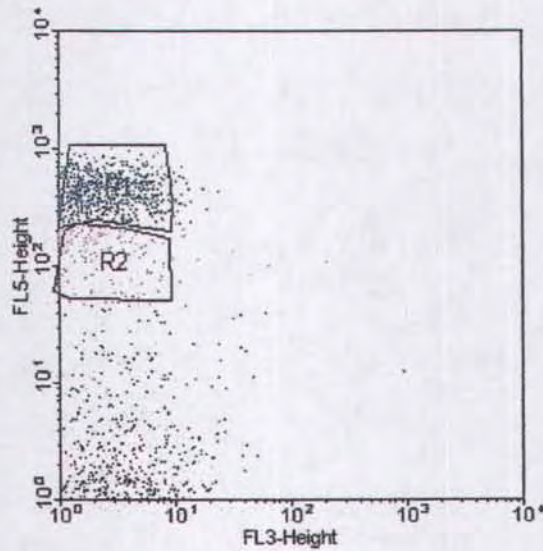


Figura 10. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides X teñidos con H33342 localizados en la región R1, en un segundo análisis por CF para evaluar el grado de pureza. Se observa un aumento en las células dañadas localizadas cerca del origen.

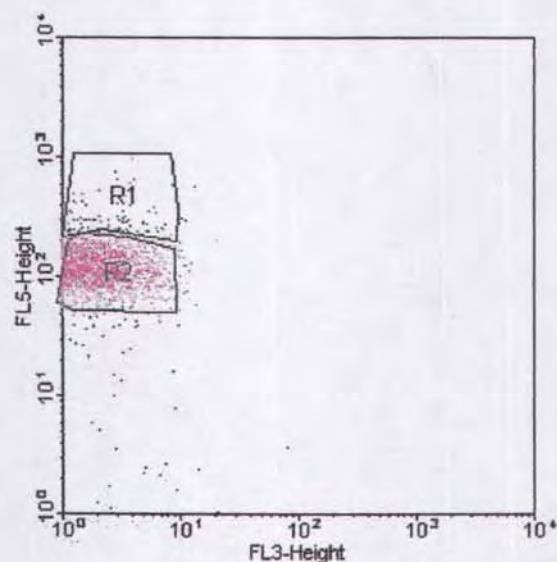


Figura 11. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides Y teñidos con H33342 localizados en la región R2, en un segundo análisis por CF para evaluar el grado de pureza. Se observa muy pocos espermatozoides dañados.

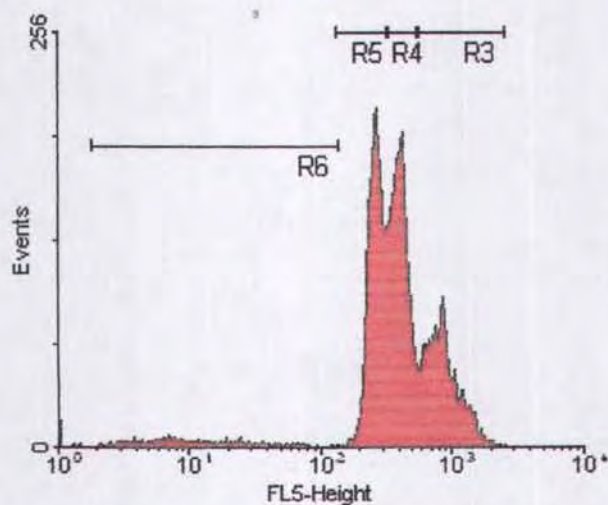


Figura 12. Histograma en el que se muestra la presencia de dos poblaciones espermáticas teñidas con H33342. Se observaron tres picos no regiones: la región R5 corresponde a la población Y, región R4 con la población X y dentro de ésta última un segundo pico que podría corresponder a espermatozoides agregados, determinado como región R3. La región R6 corresponde a las células dañadas.

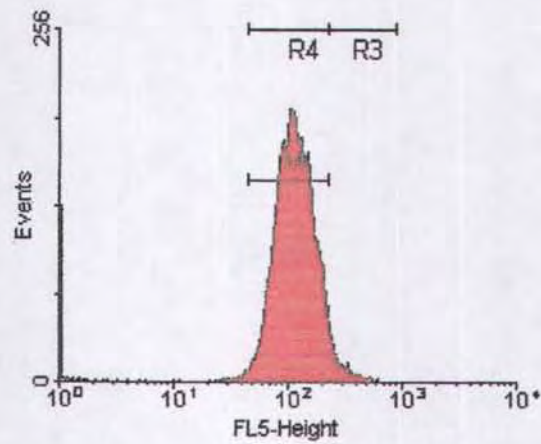


Figura 13. Histograma en el que se muestra la población de espermatozoides Y teñidos con H33342 recuperada, en donde solo se hace evidente la presencia de un solo pico o región R4.

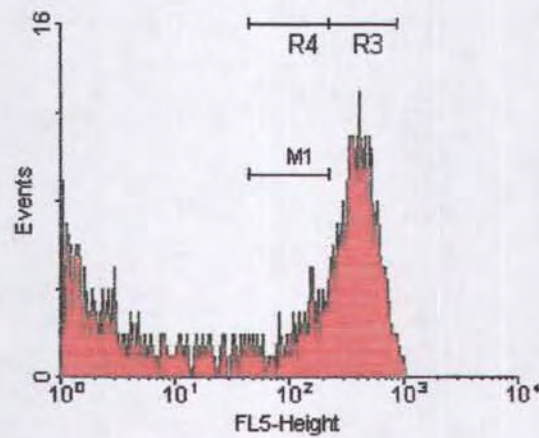


Figura 14. Histograma en el que se muestra la población de espermatozoides X teñidos con H33342, recuperada, marcada como región R3. El segundo pico o región R4 que con espermatozoides Y que contaminaron la población X, recuperada. Y cercano al origen de la gráfica un barrido cercano al origen que corresponde a células dañadas.

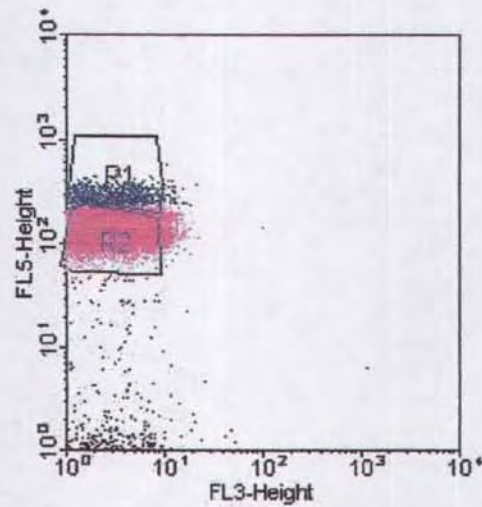


Figura 15. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides teñidos con H33342 sin periodo de incubación y recuperados en los primeros 5 minutos después de iniciado el análisis, en la cual es posible notar la presencia de dos sub-poblaciones.

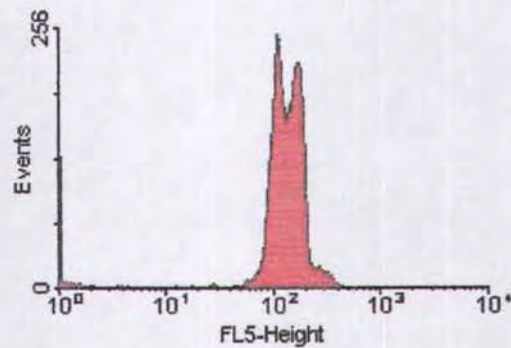
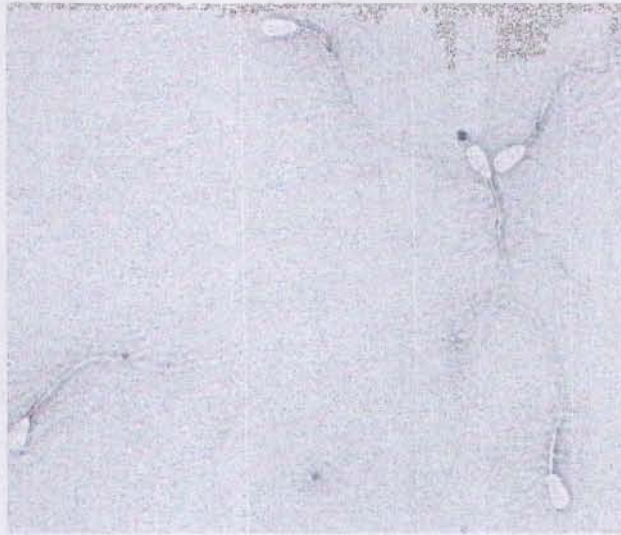


Figura 16. Histograma en el que se muestra la distribución reportada en la literatura de las dos sub-poblaciones espermáticas teñidas con H33342, en la cual se observan los picos correspondientes a los espermatozoides Y a la izquierda y a los Y a la derecha.



Fotografía 5 Espermatozoides Y recuperados vivos y teñidos con H33342, con menos de 5 minutos de incubación, permitiendo una mejor separación de las poblaciones.



Fotografía 6 Espermatozoides X recuperados vivos y teñidos con H33342 después de haber sido sexados por CF

Grupo 6. Muestras de espermatozoides comercialmente sexados, teñidos con H33342 (control)

Debido a que ya es posible conseguir dosis de semen sexado en forma comercial por CF, se adquirieron algunas pajillas de este tipo, con espermatozoides Y.

Estas fueron consideradas como control positivo, para verificar la localización correcta de la sub-población Y, lo que permitió afirmar que las muestras procesadas para el presente trabajo se manejaron de forma adecuada. Además, estas muestras permitieron observar el daño que sufren las células al ser sometidas al proceso de sexado después de ser congeladas y descongeladas, lo cual se hace evidente al observar un número mayor de células dañadas en la misma población Y (Figura 17)

Al realizar con estos datos un histograma (Figura 18), se observó que la región R1 correspondía a espermatozoides Y de la misma manera que ocurre con las muestras recuperadas de pajillas de semen no sexado comercialmente.

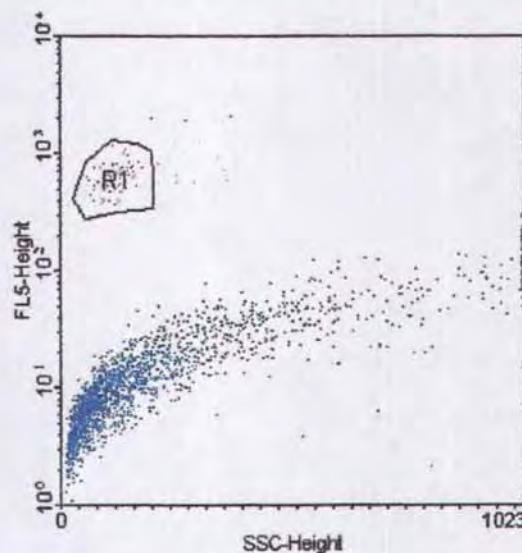


Figura 17. Gráfica de dispersión de puntos donde se observa la disposición de la población de espermatozoides Y teñidos con H33342 localizados en la región R1, que corresponde a la misma ubicación de la sub-población Y de las muestras empleadas en el resto de los grupos experimentales. La formación en cometa corresponde a las células maltratadas.

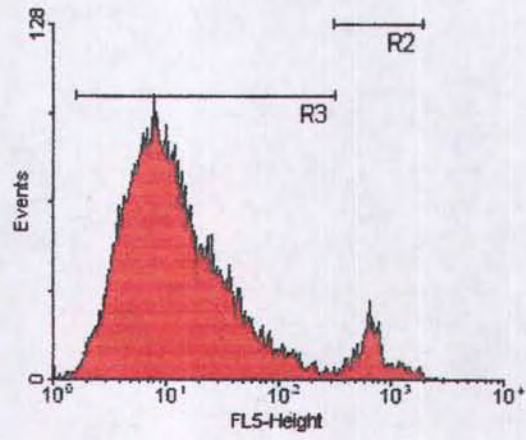


Figura18. Histograma donde se observa la disposición de la población de espermatozoides Y localizados en R2. La región R3 muestra las células maltratadas.

DISCUSIÓN

El grupo teñido con SG13 fue planeado para determinar la utilidad de éste fluorocromo como un colorante alternativo al H33342, pero no fue posible obtener con él los resultados esperados, ya que cada una de las muestras empleadas mostró un comportamiento distinto, dificultando la estandarización de la técnica. Por este motivo, se evaluó el empleo del H33342, pero a pesar de ser el colorante reportado para la realización del sexado espermático, no fue posible conseguir los resultados esperados relacionados con la recuperación de espermatozoides viables y con motilidad que podrían ser utilizados en futuros trabajos de FIV. En ambos grupos se trabajó bajo las mismas condiciones reportadas por Cruz en 2002.

El tercer grupo experimental permitió observar los efectos de mezclar los dos colorantes para ser empleados en una misma muestra de semen. Esto permitió observar como se aceleraba la aglomeración celular conforme transcurría el tiempo, lo cual planteó la posibilidad de disminuir el tiempo de incubación y el tiempo de tránsito en el citómetro de flujo.

Como los resultados obtenidos en los tres primeros grupos no eran homogéneos, debido a que cada una de las muestras procesadas para llevar a cabo el proceso de sexado espermático mostraron una localización distinta de las sub-poblaciones y la sensibilidad del fluorocromo no fue suficiente para permitir la clara separación de las sub-poblaciones a recuperar, se optó por evaluar el comportamiento del SG13 en los espermatozoides muertos formando el cuarto grupo, como resultado se obtuvo la separación de las sub-poblaciones espermáticas, lo cual no fue repetible al trabajar con células vivas, posiblemente debido a la permeabilidad de la membrana de las células muertas o a la presencia de núcleos agregados y/o degradados, debido a la pérdida de la membrana o a la ruptura del ADN espermático debida a la degradación celular debida a la muerte celular.

Al emplear muestras de espermatozoides muertos, la penetración fue mayor y permitió una clara separación de las sub-poblaciones, cosa que no fue posible repetir con espermatozoides vivos. Estos hallazgos podrían tomarse como un antecedente al momento de seleccionar al SG13 como fluorocromo vital para realizar el sexado espermático, ya que lo reportado en el presente trabajo muestra serias desventajas asociadas a este colorante al ser empleado en los espermatozoides vivos.

Es posible que la correcta separación de las sub-poblaciones en los espermatozoides muertos se haya debido a la permeabilidad de la membrana y a una degradación del ADN espermático. Esto no permitió la recuperación de espermatozoides vivos que pudieran ser empleados en futuros procesos de FIV, dificultado la culminación de este trabajo.

Sin embargo, el SG13 es ofrecido comercialmente como un colorante vital, que no daña las células y que presenta un buen nivel de intercalación en el ADN, lo cual no coincide con lo observado en este trabajo en donde las mejores separaciones de las sub-poblaciones con SG13 se obtienen cuando éste se emplea en los espermatozoides muertos.

En el grupo experimental cinco se modificaron las condiciones y los tiempos de manejo de las muestras de semen, con la finalidad de obtener espermatozoides sexados viables y con buena motilidad. Esto permitió observar que las poblaciones espermáticas claramente fueron separadas al emplear al H33342 como fluorocromo, al manejar a una temperatura de 37°C en todos los medios que entraron en contacto con los espermatozoides, reduciendo el tiempo de incubación de los mismos a 5 minutos para evitar que las poblaciones se unieran y dificultaran su recuperación. El mejor medio para el lavado de los espermatozoides fue el TNE debido a que disminuyó el número de células maltratadas y la degradación de la membrana celular al someterlo a los procesos de centrifugación, además de disminuir la agregación celular al momento de teñirlos.

Las poblaciones sexadas no fueron motiles al menos en los 45 minutos posteriores a su recuperación, lo cual no necesariamente indica que los espermatozoides estén muertos. Posiblemente su paso a través del láser conllevó a un gasto de energía de los espermatozoides (Johnson, 1989) lo cual provocó que disminuyeran casi totalmente su motilidad, sin embargo al evaluar su viabilidad con la eosina-nigrosina se encontraron vivos, por ello la prueba de motilidad puede ser tomada como única prueba de viabilidad posterior al sexado.

En general, los resultados obtenidos permiten observar que los espermatozoides recuperados no muestran un daño aparente en su integridad física como consecuencia del sexado, pero tampoco presentan una motilidad visible. Al principio se pensó que correspondían a un alto grado de mortalidad espermática después de su tránsito en el citómetro, pero esto fue rechazado como verdadero al realizar pruebas: de movilidad y viabilidad, observando espermatozoides vivos antes y después del sexado.

Pese a todos los intentos realizados para recuperar la mayor cantidad de espermatozoides viables y motiles, no se consiguió la recuperación de los mismos.

A pesar de trabajar con muestras del mismo toro y procesadas de la misma forma, los resultados obtenidos mostraron una distribución diferente de las subpoblaciones. Aunque las muestras con un mejor comportamiento de separación fueron las teñidas con H33342, éstas mantuvieron un buen nivel de separación en los primeros 5 minutos tras su tinción y su tránsito por el citómetro, ya que al estar en contacto con las células por periodos más prolongados de incubación las subpoblaciones se volvían a unir observándose solo una población, dificultado la separación adecuada de las mismas y esto posiblemente es debido a que las muestras empleadas no eran frescas sino congeladas y que el medio de congelación puede actuar como factor acelerador de la penetración del colorante

El grupo experimental seis estuvo formado por dosis de semen comercialmente sexado, el cual fue empleado como control positivo para confirmar la adecuada localización de los espermatozoides Y teñidos con H33342. Además de permitir observar el daño que sufren las células con el proceso de congelación-descongelación y del sexado por CF, al observar que la mayor parte de ellos formaban una distribución en forma de cometa (característica de las células que aunque puedan estar teñidas se encuentran maltratadas). Éstas, después de ser procesadas de la misma manera que las de los experimentos anteriores, permitieron corroborar que las muestras fueron procesadas de forma adecuada, al localizarla y compararla con la de la sub-población Y de todas las muestras procesadas en este trabajo.

VII CONCLUSIONES

Los resultados relacionados con el empleo de un equipo FACS Vantage, que se reportan en el presente trabajo, son hallazgos no reportados en la literatura, por lo cual se podrían considerar como relevantes y dignos de una futura línea de investigación que permita entender los mecanismos, por medio de los cuales el SG13 actúa en contacto con la membrana espermática, y la forma en que afecta el medio de congelación a la técnica de sexado.

Los avances logrados en un trabajo anterior y en el presente permitieron montar la técnica para realizar el sexado espermático por medio de una separación de las dos distintas sub-poblaciones, demostrando la utilidad del FACS Vantage.

La recuperación de dichas sub-poblaciones abre la posibilidad de que al trabajar con semen fresco, ya con la metodología estandarizada, se podría conseguir 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; brindando una alternativa de selección en el ganado productor de leche o de carne.

Del presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

Se logró montar la técnica para realizar el sexado por medio de CF en un equipo FACS Vantage.

El análisis por CF permitió ubicar y aislar las regiones correspondientes a las dos sub-poblaciones espermáticas, de semen de toro.

Al realizar el marcaje del ADN con SG13 se observó que dio mejores resultados en espermatozoides muertos, lo cual no tiene ninguna utilidad si la finalidad de su uso es emplear los espermatozoides viables recuperados para usarlos en ART a excepción de su uso para realizar ICSI.

Se confirmó la viabilidad aunque no la motilidad de los espermatozoides después del sexado al realizar frotis teñidos con eosina-nigrosina.

Fue posible la identificación de las dos sub-poblaciones empleando H33342 como fluorocromo, aunque conforme aumentaba el tiempo de incubación éstas se acercaban lo cual se observaba al ver un solo grupo celular, reacción no esperada.

El segundo análisis espermático o reanálisis permitió observar que la población recuperada de espermatozoides con el cromosoma Y fue la menos contaminada, al mostrar una pureza del 90%, lo cual se observó al ver muy pocas células de la subpoblación X.

VIII. PERSPECTIVAS

Sería recomendable llevar a cabo más investigaciones, encaminadas al desarrollo de mejores métodos que incorporen estrategias, que contribuyan a estabilizar la membrana de los espermatozoides para mejorar la vida útil de aquellos sexados por CF, ya que es importante la integridad de la membrana para el posible uso de los espermatozoides después del sexado, aunado a una viabilidad óptima de la célula, dada por su integridad estructural y funcional. Esto proporcionaría beneficios a la ganadería, al contribuir a realizar un rápido progreso genético, para la generación de hembras de reemplazo necesarias en los hatos lecheros y novillos de calidad superior en las explotaciones de engorda.

Los resultados que aquí se presentan se pueden considerar como relevantes y de utilidad para llevar a cabo una futura línea de investigación, dirigida a comprender los mecanismos de acción del SG13 sobre la membrana espermática como primer estructura con la cual entra en contacto y sobre los efectos del fluorocromo en la estructura y composición de su ADN, aunado a la evaluación de los efectos de los medios de congelación sobre la técnica de sexado, debido a que los espermatozoides ya sufren daño por la congelación y descongelación, el cual aumenta al someterlos al proceso de sexado, en la actualidad se cuenta con los primeros estudios reportados relacionados al comportamiento de los espermatozoides congelados-descongelados comparados con los espermatozoides obtenidos de muestras de semen fresco (Lindsey, 2002), así como la búsqueda de técnicas de congelación espermática que permitan que los espermatozoides puedan ser sometidos a un proceso de separación de las subpoblaciones espermáticas sin provocar demasiado daño celular.

La industrialización del sexado de semen depende también de los consumidores finales, ya que si se desarrollara esta técnica y se contara con proveedores eficientes en el sector público o en universidades o instituciones gubernamentales, sería posible ofrecer un buen servicio a un precio adecuado, para lograr así un importante consumo público. Esto contribuiría a impulsar la utilización masiva del semen sexado.

X. BIBLIOGRAFÍA

Buchanan BR, Seidel GE, McCue PM, Schenk JL, Herickhoff LA, Squires EL. Insemination of mares with low numbers of either unsexed and sexed spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 53: 1309–1321.

Cruz GMI. Análisis comparativo del contenido de ADN en espermatozoides de toro y cerdo por medio de citometría de flujo (tesis de licenciatura). Ciudad Universitaria (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.

Feng LY, Ma L, McKeeby JL, Chen Y, Hall L. Sexing Individual Sperm Cells During Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). *Theriogenology* 2000; 74: 1 S18 Suppl

Fugger EF. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. *Theriogenology*. 1999; 52: 1435-40

Jacobson M. XY Inc 2002 (serial online) 2005 available from: URL:

<http://www.xyinc.com/about/breakthroughs.php>

Johnson LA, Flook JP, Look MV. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for ADN using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res* 1987; 17: 203-12

Johnson LA, 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. *Gamete Res* 1988; 21: 335-4

Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by ADN and cell sorting. *Biol Reprod* 1989; 41: 199-20

Johnson LA. Sex selection in swine: Altering sex ratios in offspring following surgical insemination with flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 1991; 26: 195–204.

Johnson LA. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *J Anim Sci* 1992; 19: 8-18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Johnson LA, Welch GR, Keyvanfar K, Dorfmann A, Fugger EF, Schulman JD. Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked disease. *Hum. Reprod.* 1993; 8: 1733–1739
- Johnson LA. Sex preselection by flow cytometric separation of X- and Y-chromosome bearing sperm based on ADN difference: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7: 893–903.
- Johnson LA, Welch GR. Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999; 52:1323-1341
- Laboratorios Molecular Probe (serial online) 2004 available from URL: <http://www.probes.com/servlets/product?item=7575>
- Libbus BL, Perreault SD, Johnson LA, Pinkel D. Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoechst 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting. *Mutat Res* 1987; 182: 265-74
- Lindsey AC, Schenk JL, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL,. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* 2002a; 34: 121–127.
- Lindsey AC, Morris LHA, Allen WR, Schenk JL, Squires EL, Bruemmer JE. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. *Equine Vet. J.* 2002b; 34, 128–132.
- Lozano TJA. Cromosoma X: cartografiado y “desilenciado” (serial online) 21 de marzo de 1997 available from: URL: http://www.laverdad.es/cienciaysalud/8_5_13.html
- Lush J. The possibility of sex control artificial insemination with centrifuged spermatozoa. *J Ag Res* 1985; 30:893-913
- Maxwell WM, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999; 52:1353-62

Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Barhgate R, de Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* XXX, Available online 24 May 2004. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T43-4CFV6HJ-3&_coverDate=07%2F31%2F2004&_alid=262773327&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=4963&_sort=d&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=c302faffebfb48d8a3a7277f98758705

Page CD. Finalización de la secuencia del cromosoma Y revela un "castillo de cristal" genómico. Available online junio 19, 2003. URL: <http://www.hhmi.org/news/page5-esp.html>

Pro-diversitas. Cromosoma Y: verdadero de AND Available online 2004 URL: <http://www.prodiversitas.bioetica.org/prensa31.htm>

Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel GE. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 52: 1375–1391.

Seidel GE, Allen CH, Johnson LA, Holland MD, Brink Z, Welch GR, Graham JK, Cattell MB. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of non-frozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology* 1997; 48: 1255–1265.

Seidel GE. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 2003; 59: 585–598.

Seidel GE, Garner DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2002; 124: 733–743.

Welch GR, Johnson LA. Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X and Y-sperm by sort reanalysis for ADN. *Theriogenology* 1999; 5: 1343–1352.

Welch GR, Walsbieser GC, Wall RJ, Johnson LA. Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm. *Anim. Biotechnol.* 1995; 6: 131–139

Welch, GR., Johnson, LA. 1999: Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for ADN. *Theriogenology*; **52**:1343-52

Zhang M, Lu KH, Seidel GJr. 2003: Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*; **60** (9) 1657-1663