



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES DE
BOVINO MEDIANTE MÉTODOS FÍSICOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

MARTHA VÁZQUEZ AGUIRRE

ASESORES:

**MVZ. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ
MVZ. MA. DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA
MVZ. JORGE HERNÁNDEZ ESPINOSA**



MÉXICO, D. F.

2008



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

Cuando tuve que dejar el camino que había elegido decidí dedicarle mi vida, y cada uno de los triunfos que pudiera conquistar a mi único y gran amigo, a aquel que me confortaba en silencio y cuya simple existencia hacia de cada instante un momento especial, irrepetible, irremplazable e inolvidable.

Por que si tu vida no se hubiera cruzado con la mía y por que sí no se hubieran vuelto a separar en aquel momento desafortunado este trabajo como todos los demás nunca hubieran sido posibles, por que me inspiraste y me inspiras a ser fuerte en momentos de adversidad y por ser mi compañero fiel desde el primer día de nuestra vida juntos y hasta el último de los míos, te dedico y entrego este trabajo KORSAKOFF, amiguito de mi alma.

AGRADECIMIENTOS

Al pensar en cada una de las personas a las que tengo algo que agradecer mi lista se hace extensa, sin embargo, mis más profundos agradecimientos son para los miembros de mi pequeña y linda familia.

A mis padres, por que mi vida misma y el llegar a este momento de ella no hubiera sido posible sin su presencia y apoyo y por respetar mi silencio les doy las gracias.

A mi querida hermanita por su alegría, por estar conmigo y recordarme como sonreír, le doy las gracias.

Sin embargo, no puedo olvidar a las personas que de alguna u otra forma contribuyeron en el desarrollo y conclusión de este trabajo y con los cuales también estoy en deuda de alguna forma.

Al Dr. Román Vidal Tamayo, por que sin el la conclusión de este proyecto simplemente no hubiera sido posible.

A la Dra. Lourdes Juárez por creer en mis propuestas para el arranque y continuidad de éste trabajo y por su paciencia en el desarrollo de éste.

Al Dr. Javier Valencia por darme el beneficio de la duda y continuar trabajando en este proyecto a pesar de los cuestionamientos.

A la Dra. Icela Palma y al Dr. Rogelio Alonso por compartir sus conocimientos y abrirme las puertas de sus laboratorios.

A todos los que me compartieron un poquito de ellos en tiempo, experiencias o palabras de aliento muchas gracias.

Y por que estoy convencida de que el mundo está regido por una energía incomprensible que permite que las cosas se den en el momento más oportuno, DIOS te doy las gracias.

Finalmente, agradezco la existencia a la cultura que hoy me abraza y es la cultura Polinesia, a través de la danza. Fui afortunada al conocer esta disciplina, y fue un pilar que me soportó y me impulso a concluir este trabajo, me recordó que la vida tiene bases como la perseverancia, la constancia, la fortaleza de espíritu y la paciencia entre otros.

A todos ustedes les digo:

MAHALO NUI LOA. MAURURU ROA. (Muchas Gracias)

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| I. Introducción..... | 3 |
| II. Revisión de literatura..... | 8 |
| III. Material y métodos..... | 55 |
| IV. Resultados..... | 76 |
| V. Discusión..... | 105 |
| VI. Conclusión..... | 113 |
| VII. Anexos | 114 |
| VIII. Bibliografía | 118 |

Resumen

VÁZQUEZ AGUIRRE MARTHA. Sexaje de espermatozoides de bovino mediante métodos físicos (bajo la dirección de: MVZ. Javier Valencia Méndez, MVZ. Ma. de Lourdes Juárez Mosqueda, MVZ. Jorge Hernández Espinosa)

La posibilidad de seleccionar el sexo de la progenie antes de la concepción es una tecnología que representa una posibilidad para eficientizar la producción de alimentos de origen animal ya que permite acelerar el proceso productivo a través de diversas vías. Aunque gracias a la citometría de flujo esta posibilidad es una realidad, esta tecnología que ha mostrado ser eficiente a nivel experimental, muestra serias deficiencias al ser aplicada a nivel de campo. Por ello se considera como una posibilidad el retomar investigaciones abandonadas en el pasado de métodos de sexaje que sean menos invasivos y provoquen menor daño a las células espermáticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar 2 técnicas de sexaje de espermatozoides de toro por métodos físicos (centrifugación en gradientes de densidad y filtración en gel), ensayados previamente con semen de humano, en los que se reportaron altos grados de enriquecimiento de alguna de las poblaciones. Así mismo se trabajó con 4 técnicas de validación: tinción con quinacrina, hibridación *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR- tr) y densitometría óptica de geles de agarosa. Únicamente la técnica de PCR-tr y densitometría óptica de geles proporcionaron datos para realizar el análisis estadístico, los cuales indicaron que ninguna de las técnicas permite la separación de las fracciones. Sin embargo se encontró una diferencia numérica que sugiere la posibilidad de enriquecer la población de espermatozoides X mediante centrifugación en gradientes de Ficoll – diatrizoato de sodio, sin embargo es necesario realizar más repeticiones de la técnica de PCR-tr para corroborarlo. Las técnicas de tinción con quinacrina e hibridación *in situ* no pudieron estandarizarse.

Abstract

VÁZQUEZ AGUIRRE MARTHA. Sexing bull spermatozoa by physical methods (down direction by: MVZ. Javier Valencia Méndez, MVZ. Ma. de Lourdes Juárez Mosqueda, MVZ. Jorge Hernández Espinosa)

The ability to predetermine the sex of the offspring before the conception is a technology that represents a possibility to increase efficiency of food production since it would allow accelerating the productive process through diverse routes. Although this possibility is now feasible, thanks to flow cytometry, this technology that has been proven to be effective at experimental level, it shows still serious deficiencies to be applied under field conditions. For that reason it is plausible to consider, as a possibility, to undertake the sexing investigations methods left in the past that are less invasive and cause smaller damage to the spermatid cells. The objective of this study was to evaluate two physical methods (density gradient centrifugation media and gel filtration) to sexing spermatozoa bull, which have been used previously in human semen and it was reported the successfully enrichment of some of the sperm populations. Also we used 4 approaches to valid sex pre-selection procedures: quinacrine staining, fluorescence in-situ hybridization (FISH), real time polymerase chain reaction (rt-PCR) and gel agarose optical densitometry. The techniques of rt-PCR and gel optical densitometry were solely that provided data to do the statistical analysis, which indicated that none of them allow the separation of the fractions. Nevertheless there was a numerical difference that suggests the possibility of an enrichment of X-bearing sperm by Ficoll-sodium diatrizoate density gradient; nevertheless repetitions of the rt-PCR technique are necessary to clarify the results. Quinacrine staining and FISH technique could not be standardized.

I. Introducción

La selección del sexo de la descendencia es un tema que siempre ha interesado al humano, ya bien por motivos sociales o culturales, hecho que ha trascendido históricamente. Prácticamente en todas las culturas se han preferido tener varones en lugar de mujeres. Ello se ha fundamentado en que el hombre siempre ha tenido más funciones por ejemplo, tradicionalmente la progenie masculina era la designada para ocupar el trono de los monarcas (14), mientras que las mujeres casi siempre sólo se consideraban útiles para criar a la descendencia y otros menesteres considerados femeninos. A manera de excepción se puede mencionar casos como el de la tribu Igbo (África occidental) o la Subanun (Filipinas) en la que tener una descendiente hembra es considerado una ventaja, sobretodo por el precio que se le pone a la mujer a la hora de casarla, es decir el precio de la novia (1,2,3).

Hoy en día el deseo de seleccionar el sexo de la progenie sigue vigente y ha trascendido hasta la zootecnia (2), ya que predeterminar el sexo de la progenie es una herramienta que permite incrementar la eficiencia productiva de alimentos de forma indirecta (2, 3, 4).

En el área de la zootecnia la necesidad de optimizar al máximo la producción, así como mejorar la calidad del producto final, ha impulsado la investigación en el campo de la reproducción, dando origen a las denominadas Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA), cuyo uso como el de cualquier otra tecnología está condicionado por el beneficio real y el costo (3,5).

En el caso particular de la ganadería lechera, en México, la leche de ganado bovino ha sido considerada como un producto prioritario (6, 7).

Los avances alcanzados en la tecnificación de la producción lechera, la aplicación de técnicas en el manejo de ganado con mejores características productivas y en el equipamiento de las explotaciones, ha permitido el crecimiento de la producción de leche de bovino (6, 7).

Por otro lado, un aspecto que ha afectado el desempeño de la ganadería lechera nacional ha sido la reducción en la incorporación de reemplazos, muchos de ellos de importación, por el cierre de la frontera al ganado canadiense desde el primer semestre de 2003 y de los EUA desde principios del 2004. Una ganadería lechera creciente en México, demanda un número mayor de vientres de reemplazo para aumentar el volumen de leche producida y cubrir la demanda de vaquillas del mercado interno. Además, se sabe que las vaquillas de razas lecheras tienen un valor comercial superior a los terneros machos. Por lo que se ve la necesidad de que los hatos lecheros incrementen la proporción del nacimiento de animales de sexo hembra (6, 7, 8).

En la ganadería lechera la obtención de hembras de reemplazo con alta calidad genética para venta no es fácil, porque casi todas las hembras se conservan como posibles futuros reemplazos de la misma explotación. Un deseo de los productores especializados en la producción de leche es poder controlar la proporción de sexos de las crías nacidas en sus explotaciones, con la finalidad de obtener predominantemente hembras y de esa manera incrementar el tamaño de población de la cual seleccionar (9).

Desde hace mucho tiempo, con el propósito de mejorar la calidad genética de individuos en la ganadería se han realizado cruza de individuos con características hereditarias selectivas, Sin embargo los cruzamientos naturales en algunos casos han sido desplazados por técnicas reproductivas como la

Inseminación Artificial (IA) que tiene como ventaja primordial la obtención de prole de alto valor genético debido a la selección de un semental de características sobresalientes. Esta tecnología permite la obtención acelerada de individuos de alto valor genético, mismos que pueden ser empleados como reemplazos (10).

Una de las limitantes más importantes de la IA es el desconocimiento que se tiene del sexo de la prole, ya que uno de los principales parámetros en la producción de animales domésticos es el fenotipo sexual por ejemplo, en los bovinos productores de leche son solo las hembras las que generan este producto, por lo que son éstas las que se convertirán en reemplazos, siendo los machos vendidos como subproductos (10, 11).

Es por esto que se tiene gran interés en la manipulación de los espermatozoides para sexar el semen, y lograr la separación de los dos tipos de espermatozoide (los portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y) tanto de animales domésticos como de humanos (10).

Esta importante biotecnología ha sido estudiada durante muchos años, sin embargo, desde 1910, con el descubrimiento de los cromosomas sexuales se comenzaron a estudiar los aspectos reproductivos asociados a la genética y a partir de entonces también se han desarrollado técnicas para el sexado espermático ya que existe gran interés por encontrar un método eficaz que permita la separación de fracciones ricas en espermatozoides X y Y en semen de distintas especies. Por ello se han puesto en práctica numerosos métodos para lograr la separación espermática, muchos de ellos no lograron ser exitosas a nivel comercial, ya sea por ofrecer resultados poco precisos o escasa repetibilidad (4, 5, 12, 13, 14).

En la actualidad se han logrado grandes cambios con el advenimiento de técnicas de biología molecular, siendo la citometría de flujo la que tiene mayor eficiencia en la separación de ambas poblaciones espermáticas. A la fecha, han nacido más de 2 millones de becerras resultantes de I. A con semen sexado en diferentes países, siendo muchos de los casos experimentales pero esta tecnología se esta volviendo comercialmente viable en muchos países con el paso de los años (11).

La citometría de flujo aunque es la única técnica con altos índices de confianza, representa múltiples inconvenientes que han limitado su utilización a nivel de campo, hecho por el cual resulta muy conveniente abrir nuevas líneas de investigación o continuar con otras que han sido abandonadas con el afán de estandarizar alguna técnica alternativa que solvente los inconvenientes de la citometría de flujo y con la posibilidad de ser aplicada a gran escala (13, 15, 16).

El sexaje de espermatozoides es ya una realidad, y a pesar de que la técnica usada representa muchos inconvenientes se ha dejado de lado la investigación de técnicas alternativas. Esto es particularmente cierto para el semen de animales de especies domésticas ya que se han realizado múltiples ensayos utilizando semen de humano (15,16).

De estos ensayos, los resultados obtenidos en humanos han sido cuestionados por la inconsistencia de los mismos en las repeticiones. Sin embargo no se ha considerado que en muchos de los casos los resultados diversos puedan deberse a una o más modificaciones (17, 18).

El objetivo de este trabajo es retomar los métodos para la separación de espermatozoides X y Y que han sido ensayados con semen humano en los que

se obtuvieron resultados estadísticamente significativos y aplicarlos en el semen de toro empleando técnicas de validación con alta confianza y determinar si esos métodos son adaptables a la separación de las poblaciones de espermatozoides de bovino.

II. ANTECEDENTES

1. Determinación del sexo

1.1. Sexo cromosómico

Las investigaciones sobre la determinación del sexo que se llevaron a cabo a finales del siglo XIX y a principios del XX presentaban enfoques diferentes, según las bases teóricas y metodológicas de las distintas corrientes o disciplinas, las cuales se pueden sintetizar en dos enfoques (19):

- i. Enfoque *externalista* o *ambientalista*, que argumentaba que el sexo de los individuos está determinado por factores ambientales que actúan sobre el cigoto o el embrión en desarrollo determinando el sexo llegar a tener el individuo (19).
- ii. Enfoque *internalista* que dice que la causa de la determinación del sexo se encuentra en factores internos del cigoto. Uno de los problemas centrales era determinar cuál de los dos principales compartimientos del cigoto, el núcleo o el citosol, controlaba el desarrollo. Además era importante averiguar si los “determinantes internos del desarrollo” eran morfológicos o fisiológicos. En función de estos enfoques se formaron dos grupos de internalistas (19):
 - Internalistas embriólogos, que daban mayor importancia a determinantes fisiológicas del citoplasma y no admitían la existencia de determinantes morfológicos.
 - Internalistas citólogos, los que consideraban que los determinantes del sexo se encontraban en el núcleo de las células sexuales.
 - Internalistas mendelianos: consideraba que los cigotos son dimórficos desde el momento de la fecundación.

Fue hasta 1890 cuando se observó un cromosoma (entonces llamado cromosoma accesorio que corresponde ahora al cromosoma X) el cuál no siempre poseía morfología idéntica. El significado biológico de esta observación fue hecha por Edmund B. Wilson y su estudiante N.M Stevens en 1905, quienes mostraron que las hembras portan dos cromosomas X, mientras que el macho porta solamente uno. En adición, en algunas especies, las células masculinas contienen un único cromosoma no encontrado en las hembras, llamado cromosoma Y. De estas observaciones Wilson y Stevens concluyeron que este era el mecanismo de determinación del sexo (19, 20).

Actualmente es bien sabido que la determinación del sexo es un proceso regulado genéticamente en el que están implicados un par de cromosomas heteromórficos, denominados cromosomas sexuales (11, 21).

1.1.1. Sistemas cromosómicos en la determinación del sexo

Existen básicamente cuatro tipos de mecanismos cromosómicos de determinación del sexo: XY, ZW, XO, y los mecanismos de cromosomas múltiples. En el caso XY, las hembras poseen un par homomórfico de cromosomas (XX), como ocurre en lo mamíferos, los machos son heteromórficos (XY). En el caso ZW, los machos son homomórficos (ZZ) y las hembras heteromórficas (ZW). En el caso XO, existe sólo un cromosoma sexual, como en algunos saltamontes y escarabajos; las hembras son generalmente XX y los machos XO. Por último en el caso de los cromosomas múltiples, varios cromosomas X y Y se hallan implicados en la determinación del sexo, como en algunas chinches y escarabajos. Es necesario subrayar que no son los cromosomas en sí los que están determinando el sexo, sino los

genes que contienen. En general, el genotipo determina el tipo de gónada, que a su vez controla el fenotipo del organismo mediante la producción de hormonas masculinas o femeninas (20, 21)

1.1.2. El sistema XY

En los mamíferos, el sexo está determinado por un sistema XY, los machos son heterocigotos (XY), mientras que las hembras son homocigotas (XX), y el fenotipo masculino está correlacionado con la presencia del cromosoma Y (15). En el proceso de división celular de los gametos el material genético debe reducirse, volverse haploide a fin de que la fecundación restaure el complemento diploide. Durante la meiosis, las hembras sólo producen gametos que contienen el cromosoma X, mientras que los machos producen dos tipos de gametos: los que llevan el cromosoma X y los que llevan el Y. Por esta razón nos podemos referir a las hembras como homogaméticas y a los machos como heterogaméticos (20, 21).

En otras palabras, la clave de la determinación del sexo es la diferencia en cromosomas sexuales entre los dos sexos (22).

1.1.3. Determinación del sexo

Sólo algunos genes del cromosoma Y son requeridos para hacer que un embrión indiferenciado sea macho, la ausencia de esos genes hace que el feto se diferencie en hembra (11).

En 1991, Robin Novell-Badge y Meter Goodfellow y sus colaboradores en Inglaterra aislaron un gen denominado SRY (región del cromosoma Y determinante del sexo por Sex-determining región Y). El gen Sry se ha identificado como codificador para el *factor determinante de los testículos* (**TDF**,

testis-determining factor) (21). En presencia del TDF (genotipo XY), las gónadas primitivas se diferencian en testículos, dando como resultado un fenotipo masculino; mientras que en ausencia del TDF (genotipo XX), las gónadas primitivas no reciben la señal del factor determinante y se diferencian en ovarios, resultando un fenotipo femenino (23, 24).

Este gen asociado al cromosoma Y descrito en humanos, ratones, conejos y bovinos se ha aceptado como el gen que codifica para el TDF ya que cuando SRY es introducido en embriones de ratón con genotipo XX, estos se desarrollan con fenotipo de machos (21, 23, 24).

Es decir, el sexo fenotípico es consecuencia de la exposición del feto a las hormonas producidas dependiendo del sexo cromosómico que posea (11).

1.2. Variables asociadas a cambios en la relación natural de sexos

Durante muchos miles de años, el humano ha observado dos fenómenos relacionados con la determinación del sexo en los animales superiores: primero, en la descendencia existe una variación considerable en el número de individuos de cada sexo; y, segundo, que a pesar de esta variación, el número total de machos y hembras en la proporción es aproximadamente el mismo (22). Darwin observó que algunas especies animales pueden mostrar cambios estadísticamente significativos en la proporción de hijos e hijas que nacen, aunque las condiciones y mecanismos que promueven esos cambios son todavía en gran parte inciertos (25).

Puesto que todos los gametos femeninos contienen un cromosoma X, la probabilidad de que un gameto femenino contenga un cromosoma X es 1. Los

machos, por otra parte, producen igual número de gametos con cromosoma X que con cromosoma Y, por lo tanto la probabilidad de que un espermatozoide dado contenga un cromosoma X será $\frac{1}{2}$ y la de que contenga un cromosoma Y será también de $\frac{1}{2}$. Se deduce de aquí que la probabilidad de obtener un cigoto XY es $1 \times \frac{1}{2} = \frac{1}{2}$. Análogamente, la probabilidad de obtener un cigoto XX es también $1 \times \frac{1}{2} = \frac{1}{2}$ (22).

Así la proporción de sexos primaria es la relación de los gametos masculinos X o Y, o dicho de otra forma es el porcentaje de espermatozoides en cada eyaculado que contienen cada cromosoma sexual; mientras que la proporción de sexos secundaria es la que se calcula al nacimiento. Sin embargo, la proporción de sexos final puede ser diferente a la proporción inicialmente predicha, ya que es influenciada directamente por factores medioambientales que pueden favorecer la muerte embrionaria de alguno de los dos sexos, como el estrés, enfermedades, status social, edad y la dieta, entre otros (26, 27).

Aunque la proporción obvia es del 50% de cada sexo, se ha observado que naturalmente hay una desviación natural; en el caso de bovinos se ha observado que hasta un 51% en cada concepción resultan ser machos (11). Los mecanismos por los cuales una población se incrementa con respecto a la otra son desconocidos (28), pero algunos estudios sugieren que factores medioambientales y fisiológicos, el tiempo de inseminación durante el estro (29), así como una variación en la proporción de espermatozoides X y Y en el semen pueden ser causas de este desequilibrio (29, 30).

Desde 1970 se han desarrollado diferentes técnicas para evaluar la relación de espermatozoides X y Y en eyaculados de diferentes mamíferos. Este interés se ha dado por las evidencias que indican que la proporción de machos y

hembras en la progenie pueden variar significativamente de la relación esperada de 1:1 (29).

Aunque los mamíferos usualmente producen aproximadamente igual número de hijos que de hijas, existen algunas excepciones a esta regla general, como se ha observado en especies de rumiantes ungulados, caso en el que la hipótesis de Trivers y Willard lo atribuyen a cambios adaptativos (25). De acuerdo a esta hipótesis, las hembras con mejor condición física tienden a producir descendencia masculina ya que los hijos formarán un grupo élite que transmitirá sus genes a un mayor número de individuos en cada temporada reproductiva, por el contrario, si la descendencia fuera de hembras solo transmitirán su potencial genético a uno o dos individuos por temporada (25). Estos eventos se han observado en ciervos rojos, renos y cerdos domésticos, entre otras especies (25). En el caso de los bovinos lecheros se ha observado que las hembras que se encuentran en mejor estado nutricional tienden a originar hembras (31).

La alimentación de la madre es un factor primordial relacionado a la condición corporal, en particular dietas altas en ácidos grasos saturados, pero bajas en carbohidratos, conducen al nacimiento de mayor número de machos que de hembras, mientras que cuando el aporte calórico es suplementado en forma de carbohidratos, en lugar de grasas, predominan las hembras. Este hecho se ha estudiado en ratones (25).

Estudios recientes presentan evidencia de que el momento de la inseminación, en relación al estado de maduración del folículo dominante, influye en la relación de sexos (25). Varios estudios indican que cuando la inseminación se realiza cerca del momento de la ovulación se incrementa el porcentaje de

nacimientos de machos a un 60% (28), y cuando se realiza de forma temprana favorece el nacimiento de hembras (25, 27). Sin embargo, los resultados en diferentes estudios no son coincidentes, posiblemente el método de sincronización de celos influya de alguna forma (25).

También se ha reportado que en humanos, el uso de fármacos, como el citrato de clomifeno, modifica la relación de sexos con predominancia de hembras del 74-78% (14, 32, 33). En el caso de los bovinos lecheros Ostrowsji, *et al* observaron que hembras sincronizadas con PGF2 α tuvieron una descendencia de machos en su mayoría (70%), mientras que hembras tratadas con PGF2 α en combinación con GnRH tuvieron descendencia con predominancia de hembras en un 73% (27).

En general se han propuesto diversas hipótesis para justificar las alteraciones en la proporción de sexos, sin embargo en su mayoría no han sido rigurosamente probadas, y muchas de ellas no son exclusivas y pueden variar entre las especies (25). Entre estas tenemos:

- La diferencia en la motilidad de los espermatozoides que portan cada cromosoma.
- Diferencias en la capacidad de maduración, capacitación o dinámica de la reacción acrosomal de las poblaciones espermáticas.
- Condiciones del aparato genital femenino en relación al momento de la cópula o la IA, que favorecen a alguna de las poblaciones espermáticas (estado del moco cervical, pH).
- Diferencias en la resistencia de los embriones XX y los XY que provoquen la pérdida selectiva de alguno de ellos.

2. Fundamentos para el sexaje de espermatozoides

La evidencia científica de que son los gametos masculinos los que determinan el sexo de los mamíferos se presentó hasta inicios del siglo XX (34).

A partir de ese momento comenzaron a desarrollarse métodos que permitieran separar a los espermatozoides portadores del cromosoma X de los espermatozoides portadores del cromosoma Y, mismos que fallaron por tres circunstancias principales (34):

1. Esencialmente todos los espermatozoides son idénticos fenotípicamente.
2. Hasta inicios de los años 80's no existía ningún método que permitiera determinar la composición cromosómica de cada espermatozoide individualmente.
3. Tampoco existían métodos para determinar la relación de espermatozoides X o Y de una muestra "sexada" por lo que el único método para determinar si se había logrado modificar la relación natural 50:50 era mediante la inseminación de hembras y determinación del sexo de los embriones, fetos o descendencia al nacimiento, para lo cual era necesario cientos de observaciones.

Lo cierto es que hasta el momento no se ha identificado diferencias marcadas entre los espermatozoides X y Y; y aquellas que se han identificado son relativamente pequeñas o no tienen suficientes evidencias para fundamentarlas (35).

A continuación se mencionan algunas diferencias sugeridas entre los espermatozoides X de los Y.

a) Diferencias físicas (Tamaño, forma)

Van Muster, *et al* demostraron que el volumen de los espermatozoides de bovino portadores del cromosoma X es aproximadamente 1% superior a los espermatozoides portadores del cromosoma Y (34).

Se han realizado múltiples estudios para determinar si existen diferencias en el tamaño de la cabeza de los espermatozoides que contienen el cromosoma X de los que contienen el cromosoma Y. Chandler, *et al* utilizando video-microscopia de contraste detectaron una diferencia del 3.2% en el área de la cabeza de los espermatozoides X de eyaculados de toro, mismas que fueron reconfirmadas por ellos mismos utilizando la técnica de PCR (Polimerase chain reaction). Cui y Matthews encontraron diferencias similares en espermatozoides de humano, en donde los espermatozoides X son más grandes, verificando las diferencias observadas mediante PCR de amplificación (36).

b) Proteínas de superficie

En los años 50, Ernst Erchwald encontró que los machos presentaban una proteína sobre la superficie de sus células que no se hallaba en las hembras. Este investigador descubrió que los ratones hembra rechazaban los injertos de piel de hermanos genéticamente idénticos, mientras que los injertos de hermanas eran aceptados por sus hermanos. Esto implica la existencia de un antígeno en la superficie de las células masculinas que no está presente en las femeninas. Esta proteína se denominó antígeno de histocompatibilidad Y (antígeno H-Y), y se encontró que el gen que codificaba está localizado en el cromosoma Y, cerca del centrómero, probablemente en el brazo largo del cromosoma (21, 37, 38).

c) Contenido de ADN

A finales de 1970's e inicios de 1980's se dio un descubrimiento importante en este campo. Mediante el empleo de citometría de flujo se midió el contenido de ADN de los espermatozoides. De esta forma se evidenció una pequeña diferencia en el contenido de ADN de los espermatozoides portadores del cromosoma X de los portadores del cromosoma Y. En un principio esta diferencia fue marginal debido a la alta condensación del núcleo, lo cual dificultaba captar la diferencia cuantitativa de la fluorescencia (35, 36).

Después de detectar que existían dos poblaciones de espermatozoides que diferían en la cantidad de ADN, se realizaron ensayos con ratones normales y ratones "Cattanach" a los cuales se les induce una anomalía genética inducida químicamente que se caracteriza por una translocación de un segmento del cromosoma 7 al cromosoma X. La diferencia del contenido de ADN contenido entre los picos bimodales de espermatozoides de ratones Cattanach fue 4.9%, mientras que en ratones normales fue del 3.3%. Esto confirmó que los picos bimodales observados con citometría de flujo representa a las poblaciones de espermatozoides X o Y (35).

Una vez realizado este descubrimiento se procedió a realizar ensayos con espermatozoides de varias especies de mamíferos, observándose las siguientes diferencias en el contenido de ADN entre ambas poblaciones:

| | | |
|---------|-----------|-----------------|
| Toro | 3.7-4.2% | (3, 35, 39) |
| Caballo | 3.7 % | (3, 49) |
| Verraco | 3.7% | (3, 35, 39) |
| Carnero | 4.0-4.2% | (3, 35, 36, 39) |
| Conejo | 3.0-3.99% | (3, 39, 49) |
| Perro | 3.9% | (3, 49) |
| Humano | 2.8% | (3, 49) |

3. Técnicas de sexaje de espermatozoides

3.1. Antecedentes

Hace aproximadamente 2500 años los griegos ya escribían acerca de esta cuestión (34). Cerca del año 500 a.C. el filósofo griego Anaxágoras, se aventuró a afirmar que los espermatozoides producidos por el testículo derecho daban lugar a machos, en cambio, los del izquierdo a hembras. Esta creencia se mantuvo hasta el siglo XVIII, por lo que en aquella época no era descabellado proponer la extracción quirúrgica del testículo izquierdo para evitar la descendencia femenina (1, 40).

A lo largo de los años se han llevado muchas prácticas buscando la misma finalidad, la mayoría de ellas basadas en mitos y supersticiones. Afortunadamente, en la actualidad gracias al avance en computación, biofísica, biología celular y fisiología reproductiva asistida se dispone de la tecnología suficiente para llevar a cabo la selección del sexo (1, 35).

Actualmente la selección del sexo de la descendencia se puede realizar mediante dos tipos de técnicas (1):

1. Selección preconcepcional – consiste en la selección de espermatozoides X o Y que son los que realmente determinan el sexo de los embriones mamíferos (1).
2. Selección preimplantacional- consiste en determinar el sexo genético de los embriones y seleccionar los XX o XY, previamente diagnosticados (1).

3.2. Técnicas de selección preimplantacional

La fertilización *in vitro* y la determinación del sexo de los embriones producidos antes de la transferencia es el único procedimiento que permite seleccionar el

sexo antes de la implantación. Tiene una confiabilidad de aproximadamente el 95-97%. Las tasas de gestación son aceptables, pero el principal inconveniente es la necesidad de la alta manipulación embrionaria, razón por la cual su aplicación en el sector productivo es muy limitado (1, 15, 30).

3.3. Técnicas de selección preconcepcional

La predeterminación del sexo de la descendencia antes de la concepción agrupa a todas aquellos métodos que, basándose en diferencias existentes entre los espermatozoides X y los Y, son capaces de modificar la proporción natural de individuos machos y hembras mediante la separación de los espermatozoides portadores de cromosoma X de los portadores del cromosoma Y (15).

Durante los últimos 35 años el poder determinar el sexo de la progenie antes de la concepción mediante separación o sorteo de espermatozoides se ha convertido en un foco de atención (35). Ya que son los espermatozoides los que portan el cromosoma que determina el sexo de los mamíferos, a lo largo de la historia se han propuesto un gran número de técnicas que tienen como objetivo alterar la relación de espermatozoides X y Y, pero generalmente la separación ha sido pobre o la repetibilidad baja (41, 34, 46). A la fecha sólo un procedimiento ha provisto de la suficiente eficiencia para fines prácticos. Este procedimiento se basa en el contenido individual de ADN de cada espermatozoide detectado mediante la fluorescencia emitida por el ADN teñido con un fluorocromo (11).

3.3.1. Citometría de Flujo

Aunque los espermatozoides son substancialmente idénticos fenotípicamente, existe un método de sexaje de espermatozoides con aproximadamente el 90% de confianza llamado *citometría de flujo* que se realiza después de la tinción fluorescente del ADN con Hoechst 33342 (34). El primer reporte se remonta a 1971 por Kiddy y Hafs, el segundo en Colorado (Amman y Seidel, 1982) y el tercero en Netherlands (Johnson y Seidel, 1982) y desde entonces son múltiples los ensayos reportados (35).

Esta técnica se basa en la diferencia de contenido de ADN de los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan al cromosoma Y que va del 3 al 5% dependiendo de la especie (34, 35). En el caso de los espermatozoides bovinos, el que porta el cromosoma X contiene 3.8% más de ADN que los espermatozoides que portan el cromosoma Y (11, 35, 39).

En esta técnica, las células teñidas con un fluorocromo que se une al ADN pasan como flujo laminar y son expuestas a un rayo ultravioleta. Las células con mayor contenido de ADN captan mayor cantidad de fluorocromo y por lo tanto emiten mayor fluorescencia. La fluorescencia emitida es captada por un tubo fotomultiplicador que mediante un sistema computarizado convierte esta intensidad de fluorescencia en información cuantitativa categorizando a las células de acuerdo a la intensidad de fluorescencia emitida (11, 15, 35).

Se han realizado diversos esfuerzos para eficientizar este método de sexaje de espermatozoides logrando obtener entre un 85 y 95% (11, 34, 35) de la descendencia del sexo deseado, pero en la mayoría de los casos con reducción de la fertilidad y en consecuencia bajos rangos de preñez (11, 34).

En un inicio la técnica de sexaje por citometría de flujo fue completamente destructiva, ya que la preparación de los espermatozoides provocaba

alteraciones de la membrana, por lo que los espermatozoides sobrevivientes eran biológicamente inadecuados (35).

La principal causa en la disminución de la fertilidad es el número tan bajo de espermatozoides vivos que se recuperan del proceso de sexado (34). Cada pajilla comercial tiene una dosis que fluctúa entre $1.5 - 2 \times 10^6$ espermatozoides/ml en comparación con una dosis comercial de semen no sexado que es de $10 - 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml (11). Aun no se han identificado todas las causas de daño durante el sorteo, pero además del estrés inducido por el proceso de criopreservación, los espermatozoides son sometidos a estrés químico y físico durante el sorteo, como (34):

1. Exposición del ADN al fluorocromo (Hoechst 33342).
2. Exposición al campo electromagnético del láser.
3. Fuerza mecánica por ser transportados a velocidades de 90 Km/h.
4. Desaceleración abrupta de los 90km/h a 0 km/h.
5. Paso de los espermatozoides por un espacio estrecho.
6. Procesamiento posterior al sorteo: centrifugación, criopreservación.

Es obvio que con esta técnica son muchas las causas de daño que pueden sufrir los espermatozoides y que alteran su viabilidad (34).

Adicionalmente a estos inconvenientes, el costo elevado de cada dosis es una limitante más para su uso a nivel comercial, una pajilla de semen sexado puede superar el doble del precio de una pajilla de semen convencional (11).

La principal limitación de la citometría de flujo es la velocidad de separación, ya que a mayor velocidad, la confianza disminuye de un 91% a bajas velocidades hasta un 87% a velocidades altas. Típicamente, la velocidad de sorteo para

espermatozoides de toro se encuentra en un rango de 3000 – 4000 espermatozoides vivos/sexo/segundo, con el 90% de confianza. Esta velocidad se ha incrementado a lo largo de los años. Debido a que en el procesamiento postsorteo se pierde aproximadamente el 20% de espermatozoides, la producción neta final es de aproximadamente 10 millones de espermatozoides/hora de sexaje, que es aproximadamente la mitad del número de espermatozoides que contiene una dosis de semen congelado convencional. La velocidad de separación depende también de la orientación de los espermatozoides a través del citómetro (8,11). A pesar de los avances logrados, aun no es posible obtener suficientes espermatozoides vivos para lograr altos índices de fertilidad mediante la técnica de inseminación rutinaria. Los problemas asociados con la susceptibilidad de los espermatozoides a su paso por el aparato reproductor femenino han sido solucionados en porcinos al colocar los espermatozoides directamente en el istmo del oviducto. En bovinos se ha probado esta técnica de inseminación profunda empleando una pipeta atraumática comúnmente utilizada en la transferencia de embriones, lo cual ha permitido incrementar los rangos de preñez con dosis bajas de espermatozoides (11, 31, 35).

En algunos casos, el costo de la pajilla de semen sexado es tan elevado que las ventas de los productores son insuficientes para compensar los costos. Alrededor del mundo, la dosis típica de semen tiene un precio que oscila entre los US \$10 – 20, pero una dosis de semen sexado puede costar US \$-50, por esta razón, el semen sexado no puede emplearse a gran escala en todas las vacas de un hato, sino que tiene que emplearse bajo programas específicos de acuerdo al objetivo buscado. Algunos estudios indican que para que el uso de

semen sexado resulte rentable el costo de la pajilla debe ser menor a US \$20, pero adicionalmente la fertilidad debe mantenerse en los rangos normales, con al menos 90% de confianza de obtener el sexo deseado (31,34).

Aunque hasta el momento no se han reportado anormalidades en las crías provenientes de espermatozoides sorteados, lo ideal es que continúen los estudios en este aspecto ya que durante el proceso de sorteo es posible que el ADN de los espermatozoides sufra alguna alteración, incrementando la incidencia de anormalidades genéticas (35).

Cuando la magnitud de las imperfecciones de la técnica de citometría de flujo sean reducidas, la comercialización incrementará (34), sin embargo, debido a todas las desventajas que presenta la citometría de flujo es importante buscar tecnologías alternativas para el sexaje de espermatozoides.

3.3.2. Sexaje mediante centrifugación en gradientes de densidad

Hace casi 30 años, el Dr. Myron Brakke se convirtió en el “padre” de la centrifugación en gradientes de densidad. Su creatividad científica permitió generar esta técnica. El primer procedimiento fue simple: una muestra de virus de la papa amarilla enana fue centrifugada a través de soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones. En un inicio el empleo de los gradientes de densidad fue limitado, pero su utilidad como método de separación creció en diferentes campos de la investigación biológica (42).

Actualmente, los investigadores emplean la centrifugación en gradientes de densidad para aislar partículas tan diversas como proteínas, virus, células o sus organelos y actualmente se siguen encontrando nuevas aplicaciones (42).

Una de las mayores ventajas de la centrifugación es que permite la disgregación de las células, ya que es un método suave que preserva la función de las células separadas. (43)

Separación de espermatozoides por centrifugación en gradientes de densidad

La separación de espermatozoides portadores del cromosoma X de los portadores del cromosoma Y mediante gradientes de densidad ha generado interés y controversia desde el primer reporte (14, 32). En 1973 Ericsson *et al.*, fueron los primeros investigadores que reportaron el aislamiento de una fracción rica en espermatozoides Y de humano después del paso del semen a través de un gradiente de albúmina sérica bovina. (28, 32, 44, 45) A pesar de que este método para la preselección del sexo es el único clínicamente probado, a la fecha su uso no se ha generalizado debido a que no provee el 100% de confianza. Esto debido a que los resultados obtenidos por algunos investigadores son en ocasiones confusos o contradictorios (28, 32, 44, 45).

Así Ericsson *et al*, reportaron una recuperación del 85% de espermatozoides Y mediante el empleo de gradientes de albúmina, sin embargo investigaciones posteriores no han podido verificar clínicamente el enriquecimiento de esta población y de hecho en otros casos los estudios han mostrado enriquecimiento de la población de espermatozoides X (14).

De los procedimientos ensayados, el descrito por Iizuka, *et al* muestra los resultados más sobresalientes ya que obtienen poblaciones con el 94% de espermatozoides portadores del cromosoma X empleando un gradiente discontinuo de Percoll con 12 capas (46). Sin embargo el Percoll presenta la desventaja de que contiene sustancias tóxicas para la células lo cual interfiere

con parámetros como la viabilidad, motilidad y fertilidad (30). Además debido a su composición en algunos casos puede provocar reacciones *in útero*, como reacciones inflamatorias del endometrio (47).

Por otra parte Shartry et al empleando Ficoll - metrizoato de sodio para fraccionar semen de humano obtuvieron una fracción con alta proporción de espermatozoides Y (hasta 76%) y otra con alta proporción de espermatozoides X (hasta 80.6%). Por otro lado, el gradiente de densidad con Ficoll ha sido usado ampliamente para la separación de linfocitos con algún daño funcional. Este compuesto también ha sido empleado para el lavado de espermatozoides ya que se sabe que no daña las células lo que constituye una ventaja sobre los demás medios de separación (29).

Sin embargo, en cuanto a las técnicas de separación por centrifugación, el fundamento de la supuesta separación de espermatozoides X y Y es incierto, los mecanismos de aislamiento selectivo de una población predominante de espermatozoides son todavía desconocidos pero se han dado diversas explicaciones. Los resultados obtenidos con la técnica de columnas de albúmina han sido atribuidos a que los espermatozoides Y se mueven más rápidamente que los espermatozoides X. En el pasado, también hubo hipótesis sobre el mayor diámetro de las cabezas de los espermatozoides X (28).

Como se ha mencionado anteriormente, el método de separación mediante gradientes de densidad tiene un fundamento sencillo, sin embargo las variables asociadas a las células que influyen en su separación son diversas e incluyen diferencias en el tamaño, peso y forma, aspectos que pueden modificar directamente la densidad de las células. Los estudios realizados indican que

aunque la diferencia en la cantidad de ADN entre los espermatozoides X y Y es mínima, es posible que sí se refleje en su peso y tamaño (32, 49)

Por ejemplo, Wang, *et al* al intentar sexar espermatozoides en medios de albúmina observaron que disminuía el número de espermatozoides diploides (XY) (32). Esto fue atribuido a influencias de la diferencia del contenido de ADN entre las dos poblaciones en el peso de los espermatozoides haciendo a los espermatozoides X, que contienen de 3.8% más de ADN, sean más pesados que los Y, haciendo que en consecuencia su velocidad de sedimentación sea superior, de forma que la población de espermatozoides X se localice en estratos cercanos al fondo. Esto sugiere que la separación en gradientes de densidad esta en relación con el peso de los espermatozoides ya que los espermatozoides X que son más pesados sedimentan más rápido que la otra población, permitiendo el enriquecimiento de esta fracción en el fondo (30).

Por otro lado Cui y Matthews (1993) observaron que, en promedio, la cabeza de los espermatozoides X de humano es más larga y ancha que la de los espermatozoides Y (11). En el caso específico de espermatozoides de toro Van Muster, *et al* determinaron que existe variación estadísticamente significativa entre el volumen de la cabeza de los espermatozoides X y Y (4%), siendo mayor la de los espermatozoides X (50, 51).

El hecho que los espermatozoides Y sean más pequeños permite postular que esta población permanecerá en capas inferiores de un gradiente, ya que la migración de la población X a través del mismo se ve dificultada por “coaliciones” con las moléculas del gradiente, mientras que el paso de los espermatozoides Y se ve facilitada.

Sin embargo hay otros factores que de cierta forma podrían estar interfiriendo en el caso exclusivo de los espermatozoides vivos como son la capacidad de movimiento. Ericsson, *et al* postularon que los gradientes de albúmina enriquecen la población de espermatozoides Y por su habilidad de nadar con mayor velocidad en fluidos viscosos que los espermatozoides X (32). Kobayashi *et al*, ensayaron el sexaje de espermatozoides en un gradiente de Percoll y demostraron que la motilidad es un factor que interfiere en la separación por centrifugación en gradientes de densidad ya que aunque no lograron separar la población X de la Y si obtuvieron un fracción que presentó mayor motilidad localizada en la superficie del gradiente, mientras que la población localizada en el fondo presentó motilidad débil (52).

Si bien los resultados obtenidos en los diversos ensayos han sido cuestionados por los métodos de validación empleados, y muchos métodos de gradientes han sido recomendados y empleados clínicamente en humanos (32, 46), algunas pruebas clínicas han mostrado que la proporción de los sexos al nacimiento es alterada por varios de los procedimientos de selección espermática (32).

Parte de la controversia es debida a que la técnica empleada para validar los ensayos de separación ha sido la tinción con quinacrina que tiñe "cuerpos Y" en los espermatozoides, y a que existen evidencias en algunos ensayos que sugieren que este método no necesariamente detecta solo al cromosoma Y (14).

Por otro lado, es posible que la variación en los resultados obtenidos en los ensayos subsecuentes es que no se hace la reproducción fiel de los métodos iniciales, es decir, las réplicas no se realizan exactamente con la metodología

inicial ya que en las publicaciones no se describe a detalle la metodología empleada y aunque las metodologías para la separación mediante gradientes de densidad es sencilla existe una gran diversidad de variables asociadas que al no ser consideradas puedan originar resultados diferentes(14).

⇒ Fundamento y Variables asociadas

La centrifugación es una técnica ampliamente utilizada en la separación y caracterización de células y macromoléculas. Su fundamento reside en el estudio del movimiento provocado sobre las partículas en suspensión (macromoléculas, fragmentos celulares, materia coloidal, etc) en un medio fluido (generalmente una solución de concentración variable) al aplicarles una fuerza radial, consecuencia de un campo centrífugo (53).

La experiencia cotidiana indica que las partículas pequeñas ($<1 \mu\text{m}$) que se hallan suspendidas en una solución son atraídas hacia el fondo del recipiente que las contiene por la fuerza gravitacional de la Tierra, este movimiento es conocido como *sedimentación* y queda parcialmente compensado por la flotación de la partícula (53, 54).

Con el objeto de promover la sedimentación de partículas de mayor tamaño o en muestras donde hay partículas con características muy similares, es necesario someterlas a fuerzas de magnitud superior a la fuerza de gravedad, lo que se consigue sometiendo a las partículas a un campo de aceleración centrífuga (53).

El *coeficiente de sedimentación* es una magnitud que caracteriza el comportamiento hidrodinámico de la partícula en función de su volumen, su masa y las características del medio (53,54).

Como el campo gravitacional de la Tierra es débil, una solución que contiene macromoléculas suele ser homogénea como resultado del movimiento térmico aleatorio de las moléculas. La velocidad de sedimentación de las partículas aumenta con la masa de la partícula y con la fuerza del campo gravitacional. Cuando una solución es sometida a centrifugación, además del campo gravitacional, la fuerza centrífuga que actúa sobre las partículas también influye en la velocidad de sedimentación (54).

Debido a que el medio ejerce una fuerza de fricción sobre las partículas, también debe considerarse la viscosidad del medio de separación. (54)

Considerando estos factores se puede concluir que:

- La velocidad de sedimentación de cada partícula es inversamente proporcional a su tamaño.
- La velocidad de sedimentación de cada partícula es directamente proporcional a su peso.
- La velocidad de sedimentación es proporcional a la diferencia entre la densidad del medio circundante y la densidad de la partícula.
- La velocidad de sedimentación es inversamente proporcional a la viscosidad del medio.
- La viscosidad del medio es directamente proporcional a la concentración del mismo.
- La velocidad de sedimentación aumenta al aumentar la fuerza del campo centrífugo.

Métodos de separación

En la sedimentación por velocidad, la muestra se coloca sobre el medio de separación y los componentes de la muestra sedimentan a diferentes

velocidades de acuerdo con su tamaño. Para estabilizar las bandas que sedimentan y evitar que se mezclen por fenómenos de convección originados por pequeñas diferencias de temperatura o de concentración de solutos, el tubo contiene un gradiente discontinuo que aumenta de concentración hacia el fondo. Después de la centrifugación, los diferentes componentes pueden recogerse por separado; la forma más sencilla de hacerlo consiste en perforar el tubo de la centrifuga y recoger gota a gota el contenido (43).

En la centrifugación en equilibrio de gradiente, las moléculas se desplazan de una menor a mayor concentración hasta que se establece un equilibrio en donde ya no hay flujo de partículas. Sin embargo a diferentes tiempos eventualmente todas las moléculas se moverán al fondo del tubo (54).

Normalmente, la sedimentación impulsará a las partículas hacia abajo, por lo que por cada tipo de macromolécula se formará una banda en algún punto a lo largo del gradiente de densidad. Las diferentes bandas pueden obtenerse cada una por separado, recogiendo cada porción en un tubo distinto (54).

En la sedimentación de equilibrio los componentes de la mezcla también se centrifugan en un gradiente; en el interior del líquido, los componentes de la muestra se desplazan arriba y abajo del tubo hasta alcanzar la zona en la que la densidad de la solución es igual a la de su propia densidad. Las bandas finales se recuperan de la misma forma que en la sedimentación por velocidad (43).

Tipos de gradientes

Un medio de gradiente de densidad está formado por dos partes: un soluto y un disolvente.

La metodología para la centrifugación en gradientes de densidad involucra dos tipos de gradientes: continuos y discontinuos (30).

Los gradientes discontinuos se forman colocando con cuidado capas del medio de separación de densidades distintas en los tubos de centrifuga. El método más ampliamente usado para producir gradientes discontinuos es comenzar con la solución más densa y colocar sucesivamente capas de menor densidad. Existe la posibilidad de cargar por arriba usando una pipeta, una jeringa o una pipeta Pasteur, teniendo precaución en la forma como se van colocando y evitando siempre la formación de aire que cause turbulencia sobre los gradientes ya formados. Aunque el método de carga por arriba es el más usado, existe también la posibilidad de carga por abajo colocándose soluciones más densas por debajo de las menos densas (43).

Los gradientes continuos son aquellos en los que la densidad antes de la centrifugación es uniforme en el medio, pero después de la centrifugación, la densidad incrementa proporcionalmente conforme la distancia al eje de rotación se incrementa (55).

Medios de separación

En la mayoría de los casos, el disolvente utilizado es una solución acuosa amortiguadora cercana al pH fisiológico, aunque tanto la composición como el pH dependen de la naturaleza biológica de la muestra que será fraccionada (55).

Obviamente, la elección del soluto y del disolvente depende de la naturaleza de las partículas que serán fraccionadas y del tipo de gradiente que se utilizará. (55)

A continuación se describen algunos de los solutos empleados en la elaboración de gradientes de densidad:

- **Sacarosa.** La sacarosa ha sido un disacárido ampliamente empleado en la separación y purificación de materiales biológicos mediante centrifugación zonal. Sin embargo presenta una alta viscosidad, lo que no le permite alcanzar grandes densidades. La molécula es además osmóticamente activa, por lo que no es la más adecuada para aislar células o componentes celulares. Por lo demás es barata y de fácil adquisición. Otras de sus ventajas es su carácter no iónico. Se utiliza en el estudio de proteínas (55).
- **Ficoll.** Se trata de un polisacárido sintético de alto peso molecular (400 kDa). Presenta un alto contenido en grupos hidroxilo por lo que tiene una buena solubilidad en medios acuosos. Además no presenta grupos ionizables que puedan servir de unión a las muestras. Es estable a pH neutro y alcalino, pudiendo ser esterilizado en el autoclave sin degradarse. Su viscosidad es menor a la de la sacarosa, aunque sigue siendo algo elevada, lo que supone un inconveniente, pero tiene la ventaja de no alterar la presión osmótica del medio. Debido a sus propiedades, el Ficoll se ha utilizado para la separación de células y partículas subcelulares mediante centrifugación zonal (55).
- **Percoll.** Se trata de una suspensión de partículas (5.15 μm) de ácido salicílico revestidas de un derivado de polivinilo (polivinilpirrolidona, PVP) (56) que presenta baja viscosidad a densidades elevadas, prácticamente no afecta la presión osmótica del medio y es estable a pH comprendidos entre 5 y 10. Es soluble en solución acuosa y estable

en ellas siempre que no haya aniones bivalentes (sulfato), especialmente a bajos pH. El compuesto puede ser utilizado para centrifugaciones zonales, gradientes preformados, o bien para centrifugación isopícnica, ya que la centrifugación de Percoll en rotores angulares durante 20-30 minutos y 20.000-100.000 xg produce un ligero gradiente, independientemente de la densidad inicial del mismo (55).

- **Derivados iodados del ácido benzoico.** Son biológicamente inertes. Pueden ser iónicos (metrizoato) o neutros (metrizamida y Nycodenz). Presentan una densidad máxima de 1.4 g/ cm³, una gran estabilidad y fácil formación. Son útiles en estructuras sensibles a la fuerza iónica. Sin embargo tienen el inconveniente de que normalmente presentan precios elevados (55).

3.3.3. Filtración en Sephadex

La filtración en gel, también llamada exclusión por tamaño, permite separar moléculas de acuerdo a diferencias en su tamaño al pasarlas a través de un gel que funciona como medio de filtración. El medio es una matriz porosa en forma de partículas esféricas que poseen estabilidad física y química, además de ser inertes. (57)

El Sephadex LH-20 es un producto hecho a partir de dextrán hidroxipropilado empleado para la separación y purificación de productos tales como ácidos nucleicos, enzimas y otras proteínas y requiere la presencia de disolventes orgánicos para mantener su solubilidad (57).

Los resultados obtenidos al filtrar semen de humano en columnas de Sephadex indican que es posible recuperar fracciones de espermatozoides portadores del

cromosoma X, sin embargo la repetibilidad es variable y en muchos casos no se han obtenido los mismos resultados al reproducir los ensayos (16, 41, 58).

El fundamento que permite explicar la separación de espermatozoides en poblaciones X y Y es aún más controversial que la separación por gradientes de densidad. Un primer postulado permite pensar que las esferas que forman al gel actúan como una especie de filtro, en el cual los espermatozoides más pequeños pueden migrar con mayor facilidad, sin embargo este fundamento contradice los resultados obtenidos inicialmente por Steeno, *et al* quienes obtuvieron fracciones ricas en espermatozoides portadores de cromosoma X. Investigaciones recientes señalan un modelo hidrodinámico contracorriente para el sexaje de los espermatozoides teniendo en cuenta que los espermatozoides se orientan contracorriente en fluidos dinámicos, lo cual permite “arrastrar” a los espermatozoides a través de la columna de Sephadex cuando la velocidad de elución es aproximadamente igual a la velocidad media de los espermatozoides. Lo anterior permite pensar que los espermatozoides portadores del cromosoma X son arrastrados primero que los espermatozoides Y ya que al ser más pesados también son más lentos y presentan menor resistencia a la elución por lo cual en las primeras fracciones se obtiene una mayor proporción de espermatozoides X (16).

Las variables asociadas a este método son diversas, entre ellas se puede considerar el volumen de la muestra, la relación del volumen de la muestra y el volumen de la columna, las dimensiones de la columna, el tamaño de las partículas por separar, la distribución de las partículas separadoras (gel), el tamaño de las partículas que constituyen el filtro, la densidad de empacamiento

de la columna, el tamaño del poro de la matriz del gel, la viscosidad de la muestra y del amortiguador (57).

En el caso específico del sexaje de espermatozoides, la concentración inicial de la muestra colocada es un factor importante para evitar la aglutinación de los espermatozoides, aspecto que interviene en la migración de los mismos a través de la columna (16).

3.3.4. Otros métodos

Migración en diferentes pH

Se han realizado algunos estudios para examinar el efecto de diferentes pH en la motilidad espermática. Los resultados obtenidos indican que en un pH alcalino (pH 9,0) se puede lograr el enriquecimiento de espermatozoides Y (hasta 60.28%), mientras que en un pH ácido (pH 5.5) se logra enriquecer la población de espermatozoides X (72.12%) (30).

Esta situación puede aprovecharse monitoreando y/o manipulando el pH del moco cervical al momento de la IA (30).

Swim up

Este procedimiento se basa en la motilidad de los espermatozoides. El semen es diluido con un medio de cultivo y centrifugado, el sobrenadante que contiene el plasma seminal es descartado y las células sedimentadas son colocadas sobre el medio de separación, permitiendo a los espermatozoides nadar libremente. Entre otros inconvenientes, el empleo de esta técnica requiere de mucho tiempo y en algunos casos puede ocurrir contaminación bacteriana (47).

Modificaciones genéticas

Una forma de manipular el sexo es a través de modificaciones transgénicas. Con ellas se ha logrado modificar a 2:1 la proporción de sexos en ratones

transgénicos. Aunque teóricamente es posible lograr esta distorsión en la proporción de sexos en ganado bovino, esto sería extremadamente costoso, y poco factible tecnológicamente (11).

4. Técnicas de validación

El desarrollo y estandarización de una técnica de sexaje de espermatozoides necesita la verificación precisa de la pureza de los espermatozoides sexados para su aplicación práctica (29).

Se han desarrollado diversas técnicas que permiten monitorear la eficiencia de técnicas de sexaje de espermatozoides entre los que se encuentran: la tinción con quinacrina para la identificación de espermatozoides con cromosoma Y; southern blotting cuantitativo, PCR semicuantitativa para detección del cromosoma X o Y, eventualmente asociadas con análisis autoradiográfico, análisis con PCR de espermatozoides individuales, y la electroforesis capilar entre otros (59, 29).

El principio fundamental de la mayoría de las técnicas de validación consiste en evaluar si ha existido una desviación de la proporción de los espermatozoides X y Y que en una muestra de semen es de 50:50 (35).

4.1. Fluoroscopia

4.1.1. Tinción con quinacrina

La quinacrina es una sustancia que inicialmente se empleó para la obtención de bandas Q en los cromosomas para su identificación, ya que muchos tienen tamaños y morfologías similares (60).

El descubrimiento de Barlow & Vossa de que el brazo largo del cromosoma Y del espermatozoide humano emite mayor fluorescencia que el resto de los cromosomas mediante la tinción con el fluorocromo quinacrina permitió la diferenciación de los espermatozoides con cromosoma Y de los espermatozoides con cromosoma X (28). Esto se observa como un punto de mayor fluorescencia en la cabeza de los espermatozoides portadores del cromosoma Y, que se ha denominado cuerpo Y o cuerpo F (28, 46).

Esto es, la prueba del cuerpo Y se basa en la observación subjetiva de un cuerpo brillante en la cabeza de los espermatozoides teñidos con el fluorocromo quinacrina (41).

Aunque cierto número de investigadores han confirmado este hallazgo, han habido diserciones ocasionales, y en consecuencia se ha cuestionado la validez de la técnica de tinción con quinacrina ya que otros estudios demuestran que es posible que únicamente el 35% de las células totales lo presentan mientras que otros sugieren que solo en el 25 al 50% de los espermatozoides con cromosoma Y lo manifiestan (28, 46).

La mayor parte de los ensayos realizados para el sexaje de espermatozoides mediante gradientes de densidad han sido validados mediante esta técnica. Debido a los falsos positivos y negativos reportados, se ha sugerido que la presencia del cuerpo Y no es un estimador real del número de células con cromosoma Y, suscitándose múltiples debates en donde finalmente se concluyó que lo más recomendable es emplear métodos más específicos, como la hibridación *in situ* fluorescente (32, 46).

Por otra parte, el mecanismo implicado en la evidenciación del cuerpo Y no ha sido explicado. En el caso del bandedo, se cree que la quinacrina se une al

ADN intercalándose, en las zonas ricas en A-T produciendo una fluorescencia fuerte, dando así las bandas Q. Probablemente el cuerpo Y es una región con abundantes A-T presente en el cromosoma Y humano pero no así en el cromosoma Y de otras especies incluyéndose el toro (60).

Es decir, la presencia del cuerpo Y sólo se ha demostrado en algunos animales, y en el caso de los bovinos los resultados son aún controversiales por el escaso número de ensayos realizados para evidenciar la presencia del cuerpo Y (61).

4.1.2. Hibridación *in situ* (FISH)

La técnica de hibridación *in situ* es una técnica de fluorescencia que permite la localización directa de un gen e involucra el empleo de una cadena de ADN marcada que corresponde al gen o parte del gen que se quiere identificar; ya que una cadena de ADN tiene la capacidad de unirse (hibridar) con su cadena homóloga debido a la complementariedad de las secuencias de nucleótidos como a continuación se explica (30, 61).

Una molécula de ADN consta de dos cadenas unidad de forma específica. Cada cadena consta de una secuencia lineal de nucleótidos. Todos los nucleótidos de ADN contienen la misma molécula de azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato idéntico, pero su tercer componente, una base nitrogenada tiene cuatro posibles formas (Adenina: A, Guanina: G, Timina: T; Citosina: C) que dan lugar a cuatro nucleótidos diferentes: dAMP (Desoxiadenosin 5' fosfato), dGMP (Desoxiguanosin 5' fosfato), dCMP (Desoxicitidin 5' fosfato) y dTMP (Desoxitimidin 5' fosfato). Cada cadena de ADN tiene un fosfato 5' en un extremo (llamado "extremo 5'") y un OH 3' en el otro extremo (llamado "extremo 3'"). Los nucleótidos de una cadena se mantienen unidos mediante enlaces

covalentes entre el fosfato 5' de un nucleótido y el OH 3' del nucleótido adyacente. Las dos cadenas que constituyen la molécula de ADN se mantienen juntas por puentes de hidrógeno específicos entre A con T y G con C dando lugar a los pares de bases A:T y G:C. Como A se enlaza sólo con T y G se enlaza sólo con C, una cadena de ADN es complementaria a la otra y su secuencia de bases puede predecirse a partir de la secuencia de bases de la otra. Una consecuencia adicional de este apareamiento entre bases es que las dos cadenas enlazadas forman una espiral o hélice. Si la doble hélice es desenrollada de modo que las dos cadenas se separen, la secuencia de nucleótidos que esté presente en la sonda podrá aparearse con las bases ahora desapareadas de cada cadena, formándose ADN híbrido donde sean complementarios con cada una de las originales. (21, 22)

El método comprende dos fases: 1) marcaje de la sonda con un fluorocromo; 2) la hibridación en sí. Existen diversos métodos y consideraciones de la primera fase, mientras que la segunda, es más sencilla y comprende tres pasos básicos: fijación de la muestra de interés en una laminilla, hibridación de los fragmentos de ADN marcados con el ADN genómico de la muestra y la observación al microscopio (62).

Con FISH se puede determinar visualmente la presencia de una secuencia particular de ADN en una célula y consecuentemente es posible identificar la presencia del cromosoma X o Y en los espermatozoides (32, 63). La hibridación específica ocurre únicamente si existe suficiente complementariedad entre sonda marcada y la secuencia de ADN de las células (61).

Sin embargo, el empleo de la FISH con un solo cromosoma es limitado en la determinación del sexo de los espermatozoides ya que no es posible saber con certeza si las células que no están marcadas contienen al otro cromosoma o si la ausencia de la marca se debe a la inhabilidad de la sonda para entrar al núcleo espermático. Esto puede causar una alta proporción de resultados erróneos, particularmente si la eficiencia de marcaje es bajo o variable. Para evitar esta complicación, se recomienda el empleo de la hibridación *in situ* con marca doble que es una técnica que simultáneamente identifica a dos cromosomas en un espermatozoide (32).

Técnicas de marcaje de sondas para FISH

Un paso fundamental en la hibridación *in situ* es la síntesis de un fragmento de ADN marcado con una molécula fluorescente, para lo cual existen varias técnicas:

- Nick translation.

Esta técnica permite marcar ADN de doble hélice mediante dos reacciones mediadas por dos enzimas. En la primer reacción una de las hebras de ADN es cortada por una ADNsa (deoxirribonucleasa I) generando una muesca en el ADN que se denomina *nick* (62).

El efecto neto es el corte y remoción de nucleótidos a lo largo de la hebra de ADN en dirección 5' a 3' de cada nick. En este sitio, la segunda enzima, la ADN polimerasa, adiciona nucleótidos marcados con un fluorocromo o con radiactividad quedando estas moléculas incorporadas en la cadena original de ADN (62).

A continuación se añaden al medio nucleótidos, uno de ellos marcado con el fluorocromo, y la enzima ADN polimerasa I. Así, la ADN polimerasa I utiliza su actividad exonucleasa para ir sacando nucleótidos a partir de las zonas en las que fueron rotos los enlaces fosfodiéster y su actividad polimerasa irá colocando nuevos nucleótidos e ir sintetizando una nueva cadena, utilizando nucleótidos del medio y, entre ellos, los marcados. En último término se obtiene una monocadena de ADN complementaria marcada que podrá ser utilizada como sonda (64).

- Random Priming.

Es otra técnica de marcaje que se fundamenta en la utilización de cebadores inespecíficos (hexámeros), que se unirán aleatoriamente al ADN previamente desnaturalizado y servirán como cebadores para la acción de la ADN polimerasa. Así, la ADN polimerasa sintetizará cadenas nuevas complementarias utilizando nucleótidos del medio, algunos de ellos marcados con el fluorocromo (64)

4.2. Análisis del ADN

4.2.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo, además de ser una técnica para el sexaje de espermatozoides, ha sido utilizada como prueba de validación de otras técnicas de separación de espermatozoides, pues evalúa el grado de enriquecimiento de las poblaciones de espermatozoides X o Y (35).

Las técnicas de separación que han sido validadas mediante citometría de flujo incluyen: sedimentación, electroforesis, filtración en Sephadex, centrifugación en gradientes de densidad, entre otras (35).

4.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR- polymerase chain reaction*) es una técnica de genética molecular que se basa la desnaturalización, alineamiento con un cebador y la extensión (replicación) del ADN lo cual permite amplificar un segmento específico de ADN para su estudio obteniendo al final un gran número de copias de dicho fragmento por hora (65, 62).

Mediante esta técnica es posible determinar la presencia de un gen en el ADN de una muestra determinada.

Si una región de ADN ha sido clonada y secuenciada, la secuencia puede ser usada para “recuperar” partes de la región equivalente (65).

La amplificación de ADN mediante PCR es un proceso similar a la replicación de ADN *in vivo* en el que a partir de cada hebra de la doble hélice de ADN se obtienen 2 copias iguales por la acción de la ADN polimerasa. Para que este proceso se realice artificialmente son necesarios cuatro elementos: ADN obtenido de la muestra de interés, una secuencia corta de ADN complementaria a los extremos del ADN a amplificar (*primer* o cebador), deoxirribonucleótidos (adenina, tiamina, citosina, guanina) y la ADN polimerasa (62).

Una ADN polimerasa resistente a altas temperaturas (la Taq polimerasa, producida por la bacteria *Thermus aquaticus*), es utilizada para catalizar la síntesis de fragmentos de ADN. Cada uno de los cebadores colocados en hebras opuestas crece en direcciones opuestas (62, 65).

Con está técnica una copia única de un gen puede ser detectado después de la amplificación, siempre y cuando se provean los cebadores sintetizados en correspondencia a una secuencia conocida de un gen (65).

Uno de los requerimientos para la secuenciación del ADN es la habilidad para obtener un fragmento definido de ADN . Es decir para obtener copias de una secuencia específica de ADN primero se requiere determinar la secuencia de nucleótidos de interés (65).

Cada reacción de amplificación de PCR tiene diferentes pasos. En el primero, el tubo con la reacción es calentado a más de 90°C para que la doble hélice de ADN se desenrolle y se separen las dos cadenas (*desnaturalización*), de modo que cada una sirva como plantilla o molde para la síntesis de nuevas copias (62). En el segundo paso la temperatura disminuye (52°C) con lo cual los dos cebadores se alinean con su secuencia complementaria en cada plantilla (*alineación*). La *Taq* polimerasa utiliza los deoxirribonucleotidos para extender cada cebador según su complementariedad con la hebra molde (62).

Después de terminarse la replicación de un segmento, entre dos cebadores (un ciclo), los dos nuevos duplicados son desnaturalizados mediante calor, para generar cadenas simples que servirán a su vez como plantillas o moldes para producir cada una dos nuevas copias en un segundo ciclo. La repetición de ciclos de síntesis y desnaturalización resulta en un incremento exponencial en el número de segmentos replicados. Cada copia obtenida es un clón de la plantilla original de ADN (65).

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y presenta una probabilidad relativamente alta de obtener falsos positivos por contaminación. Para solucionar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y; realizar una adecuada manipulación de la muestra, el

equipo y de los reactivos. La reciente introducción de técnicas de fluorescencia a la PCR, en conjunción con los instrumentos capaces de amplificar, detectar y cuantificar los niveles de ácidos nucleicos, han formado la base para una técnica que permite solucionar el problema de la cuantificación que se tenía con el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como **PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (66)**.

La PCR cuantitativa o en tiempo real (PCR-tr) se basa en el seguimiento de la síntesis de cada copia de ADN de forma indirecta mediante la detección de fluorescencia producida en la reacción. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando (67).

Para llevar a cabo la PCR en tiempo real se emplean termocicladores especiales que incorporan un lector de fluorescencia, diseñados para poder medir en todo momento de la reacción, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas de forma especial (67) .

- a) Agentes intercalantes: Son fluorocromos que se insertan entre las bases de una molécula de ADN y aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida (66,68).
- b) Sondas de hibridación específicas: Es un sistema compuesto de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las

sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas los dos fluorocromos están próximos. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas, cuando al ser excitado el donador (3') transfiere su energía al aceptor (5') (68)

La cuantificación de ADN puede ser absoluta o relativa y se realiza a través del *ciclo umbral* (Ct) que es el parámetro fundamental a partir del cual se realizan todos los cálculos para la obtención de los resultados de la medición; se define como el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de copias de la muestra. En la cuantificación absoluta se requiere de la construcción de una curva estándar absoluta de los valores Ct para cada amplicón de forma individual para calcular el número de copias preciso del ADN replicado. Por otro lado existen dos métodos de cuantificación relativa, la curva estándar y Ct comparativo. En el método de curva estándar la cantidad de copias de inicio de una muestra conocida es calculada a partir de la curva estándar de un gen específico y normalizada para la cantidad de inicio de un gen referencia el cual es calculado a partir de la curva estándar. El método comparativo de Ct, detecta la expresión relativa de un gen con respecto a otro, en la cual se asume que la eficiencia de amplificación de ambos genes es relativamente igual (66)

4.2.3. Electroforesis y densitometria óptica de geles

Un método que permite visualizar ADN o fragmentos del mismo es la electroforesis en gel de agarosa, en la cual se separan en función de su tamaño. Esta técnica consiste en someter la mezcla de moléculas de ADN colocadas en un gel de agarosa a un campo eléctrico. Las moléculas de ADN son atraídas al polo positivo debido a la carga neta negativa de ambas cadenas consecuencia de sus grupos fosfato. Las moléculas más pequeñas migran más rápido que las grandes al verse menos “frenadas” por el gel de agarosa en su desplazamiento. La visualización de los fragmentos separados de ADN se da por la adición de bromuro de etidio (EtBr). El EtBr es una molécula plana con afinidad por el ADN y tiene la particularidad de que fluoresce cuando está unido a él. Para evidenciar el ADN, el gel es iluminado con luz UV, de forma que las bandas de fluorescencia observadas corresponden a fragmentos de ADN de diferente tamaño. Es posible realizar una semicuantificación de los productos de amplificación si se mide la densidad óptica de las bandas y se compara con un control (69).

4.2.4. Cariotipo

El cariotipo se refiere a la identificación de los cromosomas teñidos de una célula, usualmente basadas en el ordenamiento de los mismos de acuerdo a su longitud (63). Este método permite la observación directa de los cromosomas contenidos en una célula (41). Durante la metafase, es posible observar el número, tamaño y morfología de los cromosomas con un microscopio óptico tras un tratamiento adecuado de las células (60). Los cromosomas son identificados por su tamaño, la posición de su centrómero y por el diseño de las

bandas. El tamaño de un cromosoma depende de la longitud de sus brazos, mientras que su forma depende de la posición del centrómero, que se manifiesta como una constricción (21).

Para adaptar esta técnica a la evaluación de los espermatozoides es necesaria la activación de su material genético que se realiza posterior a su fusión con el ovocito ya que la cromatina espermática está fuertemente compactada en su forma condensada lo cual impide la identificación individual de cada cromosoma, después de la penetración del ovocito maduro sigue la descondensación de la cromatina espermática, lo cual permite el análisis de los cromosomas en metafase (41, 61).

4.2.5. Inseminación Artificial

El método definitivo para evaluar el grado de separación de las dos poblaciones de espermatozoides es la evaluación de la relación de sexos de las crías nacidas en las hembras inseminadas con las fracciones ricas en espermatozoides X o Y, aunque este es la última opción (41).

El reporte del nacimiento de gazapos producidos con espermatozoides sexados por citometría de flujo fue la evidencia biológica que confirmó la validez de esta técnica. En 1982 Johnson, *et al* inseminaron conejas con espermatozoides que se suponía contenían el cromosoma X obteniendo un 94% de gazapos hembras mientras que al inseminar conejas con la fracción que se presumía contenía espermatozoides Y se obtuvo un 84% de descendencia de machos (35).

5. Aplicaciones prácticas

El sexaje de espermatozoides es una técnica de reproducción asistida que puede contribuir a alcanzar diversas metas tanto económicas como biológicas aunque varíen entre las especies de interés (31).

1. Medicina Humana

Existen razones medicas definidas que justifican la selección de la progenie humana de un sexo determinado ya que hay aproximadamente 200 enfermedades genéticas ligadas al sexo como la hemofilia, distrofia muscular, retinitis pigmentosa, hipogonadismo, feminización testicular, entre otras, en las que las hembras con genotipo heterocigoto son portadoras, afectando a su progenie masculina que las manifiesta (46, 58). La posibilidad de separar los espermatozoides X de los Y ofrece la oportunidad de seleccionar el sexo de las mujeres portadoras para que su descendencia sea de mujeres que al ser heterocigotas no manifestarían los desordenes (59).

2. Producción pecuaria

En esta categoría se estima que se puede ocupar el mayor volumen de semen sexado si los costos son bajos. El área de los bovinos productores de leche será el mercado dominante, aunque su empleo es posible en todas las especies de interés productivo (cerdos, pequeños rumiantes, etc.). Exceptuando a las aves, en las que es el ovocito y no el espermatozoide el que determina el sexo (34).

3. Animales de compañía

La justificación de su empleo se basa en aspectos emocionales más que productivos, ya que los humanos tienden a mostrar preferencia por el sexo de sus animales de compañía. Los caballos son la especie dominante para

este mercado inicialmente, aunque el mercado de los perros dominará eventualmente (34).

4. Animales de deporte

En este rubro las especies en las que se aplicaría esta tecnología son: animales para cacería como los alces, animales de carreras como los perros y caballos. En estos casos los machos están mejor valuados que las hembras (34).

5. Fauna silvestre

El empleo de esta tecnología permitiría optimizar los programas de cruzamiento para conservación de fauna silvestre (34).

6. Nichos biotecnológicos

En esta categoría se puede incluir la producción de animales para aplicación en estudios de clonación y transgénesis (34).

7. Investigación

En muchas áreas de la investigación, la predeterminación del sexo puede reducir los costos, en parte por que disminuye el número de animales requeridos en un estudio (34).

Aplicaciones en la producción de bovinos

Para apreciar la logística de introducir una nueva tecnología como lo es el semen sexado, es importante considerar la estructura de la industria de los bovinos, donde los animales tienen fines productivos por lo que este fin es el que determinará el sexo deseable de la progenie. Por ejemplo, en el ganado lechero es deseable que la mayor parte de la progenie sean hembras ya que son estas las que con el parto comienzan a producir leche, y por lo tanto

también se buscan hembras que funcionarán como reemplazos que posteriormente también tendrán ciclos lactacionales, en este caso los machos son indeseables salvo por casos excepcionales en los que se buscan hijos de madres altas productoras que funcionarán como sementales (11,34).

Con el semen sexado es posible aumentar las ganancias de los productores, tanto en el ganado lechero como de carne, pues la obtención de crías del sexo deseado ofrece las ventajas de la diferencia en el valor de machos y hembras para propósitos específicos del mercado (8).

Aplicaciones en la producción de bovinos lecheros

El semen sexado puede contribuir a incrementar la rentabilidad en la producción de bovinos lecheros a través de diversos caminos logrando objetivos tanto comerciales como de mejoramiento genético, aunque el empleo de semen sexado no influya directamente en la producción lechera (31).

Consideremos que la inseminación artificial cumple con dos propósitos: en primer lugar provocar que las vacas queden gestantes para que con el parto inicie subsecuentemente la lactación, es decir, la inseminación es un “iniciador de la lactación”; en segundo lugar producir becerras que servirán como reemplazos o para su venta (31).

Los productores lecheros pueden emplear el semen sexado para producir reemplazos de vacas genéticamente superiores (31,8) incrementando el valor tanto genético como comercial de las becerras. Para este propósito, las vacas que funcionarán como madres deben poseer los méritos genéticos y económicos estimados para la producción lechera, de esta forma se puede lograr un avance genético de un 9 - 15%. (31)

Los beneficios de obtener reemplazos genéticamente superiores:

La producción de reemplazos y la velocidad de mejoramiento genético puede acelerarse si se asocia el sexaje de espermatozoides con técnicas como la superovulación y transferencia de embriones (11).

Con esta tecnología es posible disminuir el costo de evaluación de toros mediante la evaluación de su progenie ya que partir de una elite pequeña se requiere un menor número de vacas elite para producir determinado número de hijas (31).

Por otro lado el sexaje de espermatozoides puede ser asociado a la fertilización *in vitro* (34, 35). Hasta ahora con la fertilización de ovocitos maduros se ha realizado la producción y posterior transferencia de los embriones, así como la congelación de los mismos, logrando la preñez de las vacas a las que se transfirieron (70). La tecnología de FIV combinada con semen sexado ha tenido resultados prometedores en la fase experimental que permitirían lograr la producción comercial de embriones de sexo predeterminado en un futuro, sin embargo, esta tecnología aun debe optimizarse antes de su aprovechamiento a nivel de campo (70, 71). A nivel experimental se ha logrado la producción de descendencia de sexo predefinido en bovinos, cerdos, caballos, borregos, conejos y humanos (72).

Adicionalmente, el empleo de semen sexado puede influir directamente en el bienestar animal al disminuir la incidencia de distocias en vaquillas al seleccionar para el nacimiento de becerras las cuales son más pequeñas que los machos (34).

Además, la preselección del sexo de la descendencia evitaría el sacrificio de los becerros y la pérdida que esto ocasiona, ya que en México la mayor parte de los becerros se mandan al rastro a los pocos días de nacidos (8).

Aplicaciones en la producción de bovinos productores de carne

Por sus características productivas (ganancia diaria de peso, rendimiento en canal, etc) los machos son mejor valuados que las hembras, aunque las hembras tienen un valor especial ya que son necesarias como reemplazos para producir a los machos (34).

6. JUSTIFICACIÓN

La citometría de flujo es hasta la fecha el único método que ha mostrado ser efectivo para la separación de los espermatozoides X y Y, sin embargo representa múltiples desventajas entre las que destacan que es invasiva y se provoca gran estrés a los espermatozoides. Por otro lado las técnicas de separación físicas (centrifugación en gradientes de densidad y filtración en gel) dañan menos a las células espermáticas por lo cual representan una alternativa para incrementar la eficiencia de separación de las dos poblaciones.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar si los métodos de separación físicos (por gradientes de densidad y filtración en gel) ensayados en humanos pueden ser utilizados en bovinos para separar las poblaciones de espermatozoides X y Y.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Ensayar el método de gradientes de densidad con semen de bovino en dos medios de separación: albúmina sérica bovina (BSA) y Ficoll - Diatrizoato, para evaluar la separación de las dos poblaciones.
- Ensayar el método de filtración en gel Sephadex™ para evaluar la separación de las dos poblaciones.
- Validar los métodos de separación de espermatozoides mediante las técnicas de identificación del cuerpo “Y”, hibridación *in situ*, PCR de tiempo real y densitometría óptica de geles.

9. HIPÓTESIS

Sí la cantidad de ADN entre los espermatozoides X y Y del bovino genera diferencias en su densidad específica y tamaño de la cabeza esto permitirá la separación de las dos poblaciones mediante métodos físicos (centrifugación en gradientes de densidad y filtración en gel).

III. Material y métodos

1. Toma y transporte de muestras

Las muestras fueron obtenidas de 2 toros pertenecientes a Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM ubicado en el kilómetro 28.5 de la Carretera Federal México – Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° longitud Oeste a una altura de 2760 metros sobre el nivel del mar, el clima de la región es c (w) b (ij) que corresponde a semifrío semihúmedo con lluvias en verano y con una precipitación pluvial de 800 a 1200 milímetros anuales y una temperatura promedio de 19°C.

Se obtuvieron 10 eyaculados, para su identificación cada uno se enumeró progresivamente del 1 al 10 por el orden de obtención. Las muestras se obtuvieron mediante el empleo de una vagina artificial de forro rugoso, a una temperatura que oscilaba entre 40-42 °C. Cada eyaculado se dividió en dos alícuotas. La mitad del eyaculado fue diluido en amortiguador de fosfato salino (PBS-phosphate buffered saline, pH 7.4) a temperatura ambiente, en proporción de 3:1, mientras que la otra mitad se conservó sin ser diluido. Las muestras se transportaron al laboratorio de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

2. Preparación de las muestras

Cada una de las muestras obtenidas fue utilizada para evaluar los tres métodos de separación.

Las muestras diluidas en PBS fueron lavadas en el mismo amortiguador por centrifugación a 3500 *rpm* por 5 min y resuspendida finalmente en el mismo.

Una vez lavadas las muestras se determinó la concentración espermática mediante conteo doble en el hemocitómetro. Para su empleo en los procesos de separación las muestras fueron resuspendidas a diferentes concentraciones y medios como se especifica a continuación.

Una alícuota del semen a una concentración 30×10^6 fue almacenada en PBS a -20°C para ser empleada como control del sexaje .

El semen que fue procesado mediante el gradiente de BSA se reconstituyó en Tyrode a una concentración de 30×10^6 células/ ml.

El semen que sería separado en el gradiente de Ficoll - diatrizoato se ajustó a una concentración de 160×10^6 células/ ml en PBS.

El semen completo (sin diluir) fue empleado para ensayar la separación en columnas de Sephadex, sin recibir ningún lavado.

3. Sexaje

Los 10 eyaculados obtenidos fueron procesados por separado para el sexado de los espermatozoides por las técnicas de centrifugación en gradientes de BSA y Ficoll - Diatrizoato y filtración en gel Sephadex.

3.1. Columnas de albúmina

De la muestra de espermatozoides resuspendidos en Tyrode a una concentración de 30×10^6 células/ml se colocaron 0.5 ml sobre una columna de 1 ml de albúmina sérica bovina (BSA, AMRESCO, cat, 0175-100G) al 7.5%, incubando 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se procedió a centrifugar la columna a 1250 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 0.5 ml de Tyrode. Posteriormente la muestra recuperada fue colocada sobre una columna de dos estratos de BSA formada por 1.0 ml al 12% sobre 0.5 ml al 20%. Después de 1 hr de incubación a temperatura ambiente, la columna fue centrifugada 1250 rpm por 10 min. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla final de espermatozoides fue reconstituida en 1.5 ml de PBS para lavarla 2 veces a 3500 rpm por 5 min. Finalmente la pastilla se reconstituyó en 0.5 ml de PBS y fue almacenada en congelación a -20 °C para su posterior validación. Para este ensayo las columnas se prepararon en tubos de ensaye de vidrio de 10ml y 1.3 cm de diámetro.

3.2. Columnas de Sephadex

Cada columna fue construida empleando pipetas de plástico de 5ml con un diámetro interno de 1.08 cm. En la punta se acopló una válvula de tres vías para regular el volumen de elusión de la muestra. En la luz de salida de la pipeta se colocó una cama de fibra de vidrio para evitar la pérdida del Sephadex G-50 (GE Healthcare, cat. 17-0043-01).

Para su activación, el Sephadex G50 fue suspendido en solución Locke (0.9% NaCl; 0.042% KCl; 0.024% CaCl_2 ; 0.02% NaHCO_3), incubando toda la noche a 4°C. Las columnas fueron llenadas con el Sephadex activa do, dejándolas reposar

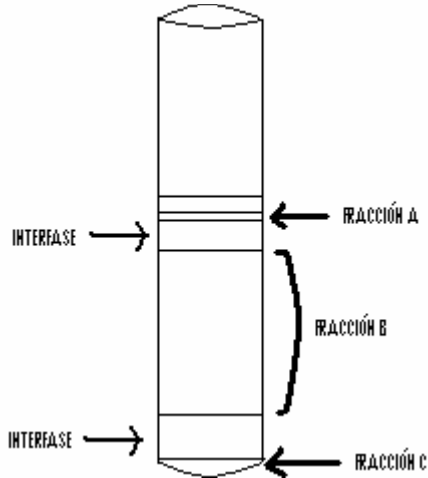
1 hora y retirando el líquido con una pipeta pasteur las veces que fuese necesario hasta alcanzar el nivel de 12 cm de Sephadex.

Por cada eyaculado, se preparó una columna sobre las cuales se colocó 1 ml de semen completo, los primeros 4 ml se dejaron eluir y se recuperaron las siguientes 4 fracciones de 1 ml. Las muestras fueron eluidas con solución Locke. Para la recuperación de las fracciones se utilizó un colector de fracciones (Bio-Rad, Fraction Collector model 2110). Todas las muestras (40 en total; 4 por eyaculado) fueron lavadas 2 veces en PBS a 3500 rpm, 5 min, y reconstituidas finalmente en 0.5 ml en PBS para ser almacenadas a -20°C para su posterior validación.

3.3. Columnas de Ficoll - Diatrizoato de Sodio

De los espermatozoides resuspendidos en PBS a la concentración de 160×10^6 células/ml, se colocó delicadamente 1 ml de muestra sobre una columna compuesta de 2.4 ml de Ficoll (SIGMA, cat, F4375-100G) al 8% en PBS adicionado con 1 ml de diatrizoato de sodio (SIGMA, cat, S4506-100G) al 32.8% en PBS, en tubos de ensaye de vidrio de 10 ml y diámetro interno de 1 cm. De inmediato se centrifugó a 700 rpm, 20 min. Después de la centrifugación se formaron 3 bandas (1 oscura y delgada en la superficie y dos más tenues y anchas de posición intermedia) separadas por 2 interfases quedando al fondo una pastilla (ver esquema 1). Las interfases fueron desechadas y cada banda así como la pastilla fueron recuperadas por separado mediante aspiración empleando una micropipeta (100/1000 μl) y depositada en viales de 1.5 ml y lavadas dos

veces con 1.5ml de PBS a 3500 *rpm* por 5 min y reconstituidas finalmente en 0.5ml del mismo amortiguador para su almacenaje a -20°C para su posterior validación.



La identificación de cada fracción obtenida se realizó con una clave en la cual el primer número correspondió al número de eyaculado, la letra equivale al proceso de separación (BSA para las fracciones obtenidas de la separación en gradiente de albúmina sérica bovina, S para las fracciones recuperadas de la filtración en gel Sephadex y F para las fracciones recuperadas del gradiente de Ficoll – diatrizoato de sodio). En el caso de las fracciones recuperadas después de la filtración en gel se identificaron del 1 al 4 de acuerdo al orden de recuperación. Las fracciones del gradiente de Ficoll se identificaron con una letra (A, B y C) por su posición en la columna de la superior a la inferior, la fracción B del gradiente de Ficoll se dividió en fracción 1 y 2. A continuación se presenta un cuadro con la identificación de las fracciones obtenidas de las tres técnicas con los 10 eyaculados:

Cuadro 1 Eyaculados y fracciones obtenidas de las técnicas de separación

| | Eyaculado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Técnica de separación | BSA | 1.BSA | 2.BSA | 3.BSA | 4.BSA | 5.BSA | 6.BSA | 7.BSA | 8.BSA | 9.BSA | 10.BSA |
| | Sephadex | 1.S1 | 2.S1 | 3.S1 | 4.S1 | 5.S1 | 6.S1 | 7.S1 | 8.S1 | 9.S1 | 10.S1 |
| | | 1.S2 | 2.S2 | 3.S2 | 4.S2 | 5.S2 | 6.S2 | 7.S2 | 8.S2 | 9.S2 | 10.S2 |
| | | 1.S3 | 2.S3 | 3.S3 | 4.S3 | 5.S3 | 6.S3 | 7.S3 | 8.S3 | 9.S3 | 10.S3 |
| | | 1.S4 | 2.S4 | 3.S4 | 4.S4 | 5.S4 | 6.S4 | 7.S4 | 8.S4 | 9.S4 | 10.S4 |
| | Ficoll-Diatrizoato | 1.FA | 2.FA | 3.FA | 4.FA | 5.FA | 6.FA | 7.FA | 8.FA | 9.FA | 10.FA |
| | | 1.FB1 | 2.FB1 | 3.FB1 | 4.FB1 | 5.FB1 | 6.FB1 | 7.FB1 | 8.FB1 | 9.FB1 | 10.FB1 |
| | | 1.FB2 | 2.FB2 | 3.FB2 | 4.FB2 | 5.FB2 | 6.FB2 | 7.FB2 | 8.FB2 | 9.FB2 | 10.FB2 |
| | | 1.FC | 2.FC | 3.FC | 4.FC | 5.FC | 6.FC | 7.FC | 8.FC | 9.FC | 10.FC |

4. Validación

4.1. Fluoroscopia

4.1.1. Tinción con quinacrina

El método descrito por Blottner, *et al* (73), fue modificado. Para estandarizar la técnica se utilizó una muestra de espermatozoides control elegida al azar, ajustando la concentración a 30×10^6 células/ml. Para descondensar el ADN de los espermatozoides, 100 μ l de muestra fueron adicionados con 100 μ l de solución descondensante compuesta de papaína al 1.25% (SIGMA, cat. P3375-25G), DL-Ditiotreititol al 0.155% (DTT, SIGMA, cat. D-0632), DMSO al 0.025% (SIGMA, cat. D5879-100ML) en Tris - HCl 50 mM (SIGMA, cat. T1503-500G) pH 8.6, y se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de ese tiempo se agregaron 200 μ l de formalina al 5% en PBS para detener la reacción y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. A esta suspensión se añadieron 400 μ l quinacrina dihidroclorada al 0.5% (SIGMA, cat. Q3251-25G) en PBS y se

incubaron a temperatura ambiente. Se tomaron alicuotas a los tiempos 1, 2, 3, 4, y 5 horas de incubación. Se realizaron frotis empleando 5 μ l de cada muestra descondensada y teñida, dejándolas secar al aire. Las laminillas fueron lavadas por inmersión en PBS y secadas al aire para fijarlas finalmente en alcohol etílico absoluto durante 5 minutos. Los frotis se montaron con PBS para su observación inmediata al microscopio de fluorescencia empleando un filtro con longitud de onda de excitación de 400-440.

4.1.2. Hibridación *in situ*

El marcaje de las sondas se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se realizaron 10 ensayos de PCR de amplificación para el marcaje de la sonda homóloga al gen satélite BRY.1 del cromosoma Y bovino cuyo producto mide 307 pb. Los cebadores fueron sintetizados por los laboratorios Biolab, la secuencia fue tomada del trabajo de Liu, *et al* (b142) siendo las siguientes:

Forward : 5' – GGATCCGAGACACAGAACAGGCTGC – 3'

Reverse: 5' – TTGATCAAGCTAATCCATCCATCCTAT – 3'

Se amplificaron los fragmentos para ambos loci a partir de 25 ng de ADN genómico de toro las mezclas de reacción fueron de 25 μ l conteniendo 1 U de ADN Taq polimerasa (Biogenica, #cat. EA-250), 1x PCR buffer (Biogenica, #cat. EA-250), 0.2 mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Biogenica, #cat. DNTP1000), 0.4 μ M de la mezcla de cebadores (forward y reverse), se probaron 3 concentraciones de MgCl₂ 1.0 mM, 1.5 mM y 2 mM. Las condiciones de amplificación usadas fueron 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C; 30

segundos a 56, 58, 60, 62 o 64 °C ; 30 segundos a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de esta reacción fueron corridos por electroforesis en geles de agarosa al 3% y purificados a partir de éste. Los geles fueron visualizados en un transiluminador y las bandas de interés cortadas con una navaja de bisturí. Cada banda seleccionada fue colocada en un vial de 1.5 ml y se agregó 1 ml de NaI 6M, a continuación cada vial se colocó en un termoblock a 55°C hasta fundir la agarosa agitando a intervalos de 5 minutos. A continuación, a cada vial se agregaron 30 µl de perlas de sílica (SIGMA, cat. S-5631) vortexeando 30 segundos e incubando 1 hora a 4°C con agitación a intervalos de 15 minutos. Al terminar la incubación se centrifugó a 12, 000 rpm 5 minutos a 4°C. La fase acuosa fue decantada y se realizaron 3 lavados con 500 µl de solución de lavado (50mM NaCl, 10mM Tris - HCl pH 7.5, 2.5mM EDTA, 50% v/v etanol) centrifugando bajo las mismas condiciones, decantando de nuevo el sobrenadante y reconstituyendo la pastilla mediante pipeteo. Finalmente la pastilla se secó en un termoblock a 55°C por 15 minutos y se resuspendió en 25 µl de agua estéril e incubada a 55°C durante 5 minutos. Se centrifugó a 12, 000 rpm por 4 min recuperando el sobrenadante en un vial limpio. La verificación de la obtención del ADN se realizó con 3 µl de cada fragmento purificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

Los fragmentos purificados fueron utilizados para el marcaje de la sonda por PCR en mezclas de reacción de 50 µl conteniendo 15 ng de los productos de PCR, 1x PCR buffer, 2mM MgCl₂, 2mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP), 1, 1.5 y

2 nM d-UTP rhodamina (Roche, Tetramethyl – Rhodamine- 5. dUTP, cat. 11534378001), 0.4 μ M de la mezcla de cebadores (forward y reverse), 1 U Taq polimerasa. Las condiciones de ciclaje fueron 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C; 30 segundos a 56°C, 30 segundos a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

Adicionalmente se realizó un ensayo para marcar la sonda por random priming. Para ello se prepararon mezclas de reacción de 25 μ l en viales de 0.5 ml, con 50 ng de los productos purificados mismos que se desnaturalizaron en el termoblock a 95°C, 5 min, enfriando 1 minuto en hielo, al terminar la desnaturalización se agregó, 1x amortiguador de reacción, 1x solución de dNTP's (-dTTP), 1nM d-UTP rhodamina (Roche, Tetramethyl – Rhodamine- 5. dUTP, cat. 11534378001), 2 U Klenow, 0.01 mg BSA (Factor V) y se incubó a 37°C, 60 minutos, pasando de inmediato a 95°C por 5 minutos y enfriando en hielo durante un minuto.

En los dos procedimientos se corrió simultáneamente un control en el cual se incluyó dTTP en concentración menor pero omitiendo dUTP-rhodamina.

Después de cada procedimiento de marcaje, los productos de las reacciones fueron corridos por electroforesis es geles de agarosa al 3% diluida en TBE 0.5x, durante 60 minutos a 100V. Se empleo una cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad) conectada a una fuente de poder (Bio-Rad). En cada pozo se colocaron 5 μ l de muestra adicionados con 1 μ l de amortiguador de muestra, y en los carriles de los extremos se colocaron 5 μ l de marcador de bajo peso molecular.

Una vez que se demostró la amplificación, los productos fueron purificados mediante filtración en columnas de Sephadex G10 grano fino en agua estéril. Se

preparó una columna por cada producto de amplificación. Se rellenaron columnas comerciales de 1.5 ml con Sephadex G10 al 10% y centrifugadas 2700 rpm por 4 min para permitir que la fase de gel sedimentara y se perdiera el líquido, posterior a la centrifugación se volvió a rellenar la camisa a tope y se repitió la centrifugación. Este paso se repitió 2 veces. Enseguida se procedió a equilibrar cada columna, para ello se adicionó una cantidad conocida de agua estéril y se centrifugó varias veces en hasta que la cantidad de agua recuperada fuera igual a la cantidad de agua colocada, en este momento la columna se consideraba como equilibrada y se procedió a filtrar los productos de amplificación. Los productos de amplificación, colocados en columnas independientes, se centrifugaron a 2700 rpm por 4 min recuperándose la porción filtrada en un vial limpio.

Para corroborar, los productos filtrados fueron corridos por electroforesis nuevamente bajo las mismas condiciones.

Todos los productos marcados y filtrados fueron empleados para ensayar las hibridaciones *in situ*.

Hibridación *in situ*

Como control se realizaron frotis de linfocitos de toro. Para ello se introdujeron portaobjetos en alcohol etílico al 50% para desengrasarlos. A una altura de 5 cm se dejaron caer 1 o 2 gotas del cultivo de linfocitos sobre los portaobjetos (ver anexo 1) y de inmediato puestos a incubar durante 10 segundos en baño maría (vapores), se dejaron secar sobre una gasa húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, los frotis fueron observados al microscopio de contraste de fases para seleccionar a las laminillas con al menos una metafases por campo,

evaluándose 3 campos por laminilla. Las laminillas seleccionadas fueron almacenadas a -20°C hasta su empleo.

Los frotis de espermatozoides de una fracción control elegida al azar, fueron realizados colocando $5\ \mu\text{l}$ de la muestra espermática a una concentración de 30×10^6 células/ml, en portaobjetos desengrasados en alcohol 50%, se dejaron secar al aire y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Para descondensar el material genético espermático, los frotis de los espermatozoides fueron tratados bajo dos procedimientos. En un primer procedimiento los espermatozoides fueron tratados con DTT (100mM) y Heparina (100 U/ml) a diferentes tiempos (15, 20, 25 y 40 minutos). Un segundo grupo de espermatozoides fueron desmembrados 10 minutos con el detergente Brij al 1.2% y descondensados con DTT (100mM) y Heparina (100 U/ml) a distintos tiempos (15 y 20 minutos). El grado de descondensación se evaluó mediante la tinción del núcleo agregando $5\ \mu\text{l}$ 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI, Vectashield, Vector, cat. H-1200) a cada frotis y montando con un cubreobjetos desengrasado para su posterior observación al microscopio de fluorescencia, empleando el filtro con longitud de onda de excitación de 330-380 nm para evaluar cambios en el tamaño de la cabeza espermática como reflejo de la descondensación del núcleo con respecto al control.

Los ensayos de hibridación *in situ* se realizaron en el laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Para la hibridación *in situ* los frotis de los espermatozoides descondensados y de los linfocitos fueron deshidratadas en concentraciones ascendentes de alcohol

etílico (70%, 80% y 100%) incubando 2 minutos a temperatura ambiente en cada uno, y se dejaron secar al aire. Posteriormente se realizó la desnaturalización mediante incubación en formamida al 70% en solución acuosa a 72°C durante 5 minutos; las laminillas se deshidrataron nuevamente y se dejaron secar al aire. Se agregaron 5 µl de la sonda BRY.1 marcada y se colocó un cubreobjetos previamente desengrasado. Las laminillas se colocaron en una termoplatina a 72°C por 2 min. Acto seguido los portaobjetos fueron sellados con cemento para evitar la evaporación de la sonda. Las laminillas selladas fueron incubadas 24 hrs a 37°C en cámara húmeda.

Después de la incubación las laminillas fueron lavadas en dos soluciones de Nonidet P40 (NP40, Roche, cat, 11 332 473 001). La primera consistió de NP40 0.3% en 0.4x SSC (Invitrogen, cat. 15557-044) a 72°C durante 2 minutos. El segundo lavado se realizó en NP40 0.1% en 2x SSC 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente pasadas tres veces en agua destilada. Las laminillas fueron secadas al aire para añadir 5 µl del medio de montaje para fluorescencia con DAPI (Vectashield, Vector, cat. H-1200) y cubiertas con un cubreobjetos desengrasado. Todas las laminillas fueron evaluadas en un microscopio de epifluorescencia (Olimpus) y analizadas mediante un sistema automatizado de análisis de cromosomas automatizado (Multiple Cytovision(TM) Automated Chromosome Analysis Systems, Applied Imaging).

4.2. Análisis de ADN de los espermatozoides sexados

El análisis del ADN de los espermatozoides sexados se realizó en el Instituto de Fisiología Celular, Biofísica y Neurociencias de la UNAM.

El ADN de los espermatozoides obtenidos por las 3 técnicas de sexado fue extraído y analizado mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-tr) con cebadores específicos del gen SRY que es una secuencia única del cromosoma Y. Como control se utilizó el gen para β -actina, ambos genes se corrieron en reacciones independientes.

Los productos de cada reacción fueron corridas por electroforesis en geles de agarosa y las bandas resultantes de la amplificación de cada gen fueron visualizadas.

Los resultados obtenidos de la PCR-tr fueron corroborados mediante PCR y densitometría óptica de los geles de agarosa.

Para determinar diferencias en la intensidad de fluorescencia entre las bandas de los genes amplificados (SRY y β -actina), se compararon las bandas de los productos de la amplificación (densitometría óptica de los geles de agarosa).

Adicionalmente se comparó la banda correspondiente al gen SRY con la muestra control de semen en la que se supone una proporción 50:50 de espermatozoides X y Y.

Finalmente se realizó una PCR cualitativa únicamente a las fracciones de aquellos ensayos en las que los dos tipos de PCR indicaron cambios significativos con respecto a los controles (fracción de semen sin sexar y amplificaciones de gen autosómico).

4.2.1. Diseño de los cebadores

Mediante el empleo del software Oligo® v. 6.8 (Molecular Biology Insight, Inc) se diseñaron dos cebadores. Uno correspondiente al gen de β -actina de un

cromosoma autosómico para ser utilizado como control positivo para todas las reacciones cuyo producto sería de 157 pb aproximadamente. Las secuencias empleadas se indican a continuación:

Forward 5'- CCC ATT GAG CAC GGC ATC GTC 3'

Reverse 5'- TCT GGG TCA TCT TCT CAC GGT TGG C 3'

El otro cebador correspondió al gen SRY bovino específico de cromosoma Y cuyo producto sería de 183 pb. Las secuencias respectivas son:

Forward 5'- AAC GCC TTC ATT GTG TGG TCT CGT 3'

Reverse 5'- CGG GTA TTT GTC TCG GTG TAT GGC T 3'

Ambos cebadores fueron sintetizados en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Antes de utilizar los cebadores previamente sintetizados se probó su pureza en los productos amplificados mediante una reacción de PCR de dos pasos. Cada cebador se evaluó por separado en microtubos de 0.25 ml donde las condiciones de amplificación fueron 94°C, 1 min; 35 ciclos a 95°C, 30 s; 68°C 30s, extensión final de 72 °C, 3 min. Los productos de amplificación fueron corridos por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% diluida en TAE 1x (tris, acetato y EDTA) y 5% de bromuro de etidio (a una concentración de 10mg/ml). A cada muestra se añadieron 3µl de amortiguador de muestra por cada 30 µl de reacción y se cargó en cada pozo 15µl de muestra. Las condiciones de corrida fueron 120V por 30 minutos. Finalmente el gel fue visualizado en un transiluminador.

4.2.2 Obtención de ADN de los espermatozoides sexados

Los espermatozoides de cada una de las 100 muestras obtenidas (10 controles, 10 fracciones de los gradientes, 40 fracciones de las columnas de Sephadex y 40 fracciones de los gradientes de Ficoll - Diatrizoato) fueron lisados y descondensados para obtener el ADN.

Para determinar la cantidad mínima de espermatozoides requerida para la extracción del ADN se seleccionó al azar una de las muestras control de espermatozoides. Los ensayos de extracción se realizaron ensayando concentraciones de 0.3, 0.5, 1 y 2×10^6 de células. A cada una de ellas se adicionaron 500 μ l de solución de lisis preparada con proteinasa K 1% - amortiguador STE (SDS, Tris, EDTA) y se dejaron incubar a 55 °C durante 60 min en un termoblock (Eppendorf, ThermoStat plus). Después de la incubación se adicionaron 500 μ l de fenol equilibrado (USB Corporation, cat. 75829) y se mezcló para después ser centrifugados a 13, 200 rpm por 10 min a temperatura ambiente. La fase del fondo fue descartada y se repitió el procedimiento 2 veces, A la fase conservada se le adicionaron 500 μ l de fenol – cloroformo (USB Corporation, cat. 75831) centrifugando bajo las mismas condiciones, se descartó la fase inferior y se realizó dos veces el procedimiento, recuperando después de la última centrifugación la fase superior. Esta fase fue colocada en otro vial y fue adicionada con 1 ml de etanol absoluto, mezclando gentilmente. En seguida se agregaron 50 μ l de acetato de sodio 3M pH5 y se incubó a -20°C durante 20 minutos. De inmediato se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a -4°C. El sobrenadante fue aspirado y desechado al resto del tubo se añadió 1 ml de etanol al 70% agitando

gentilmente y el alcohol fue retirado por aspiración, finalmente se reconstituyó el ADN con agua estéril.

La técnica se repitió empleando una concentración de 1 millón de espermatozoides en las fracciones obtenida de los ensayos de sexaje 1, 2 y 9 (controles, fracción de BSA, fracciones de Sephadex y de Ficoll - Diatrizoato).

La concentración del ADN de cada ensayo realizado fue determinada mediante absorbancia a 260/280 nm empleando un espectrofotómetro (NanoDrop, ND-1000). Sin embargo, debido a que las lecturas obtenidas no fueron constantes se decidió ensayar otra técnica para la extracción del ADN empleando las mismas muestras.

Un millón de espermatozoides fueron incubadas durante 40 minutos a 37°C, v/v en solución de lisis compuesta de papaína al 1.25% (SIGMA, cat. P3375-25G), DTT al 0.155% (SIGMA, cat. D-0632), DMSO al 0.025% (SIGMA, cat. D5879-100ML) en Tris- HCl 50 mM (SIGMA, cat. T1503-500G) pH 8.9. A continuación se agregaron 5µl de CTAB al 5% y se centrifugó a 8000 rpm durante 3 min en una microcentrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5415 R). Se retiró el sobrenadante y se reconstituyo la pastilla con 100 µl de agua destilada volviendo a centrifugar a la misma velocidad y tiempo. En seguida se retiró el sobrenadante y la pastilla se reconstituyó en 50 µl de Tris-HCl 50 mM pH 8.9. A cada muestra se adicionaron 20 µl de SDS al 10% y 20 µl de DTT 90 mM, y se dejó incubar 45 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se agregaron 200 µl de acetona helada (-20°C) y posteriormente las muestras fueron centrifugada s a 8000 rpm por 3 min. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante y a la pastilla se

le agregó 1ml de etanol absoluto agitando ligeramente. El etanol fue retirado por aspiración y la pastilla se reconstituyó con 50 μ l de agua estéril.

Se cuantificó la concentración del ADN a una absorbancia de 260 nm y simultáneamente se determinó la relación 260/280 nm mediante espectrofotometría (NanoDrop, ND-1000). Se seleccionaron las muestras con concentraciones superiores a 40ng/ml y relación 260/280 de al menos 1.5.

Empleando esta técnica se extrajo el ADN de todas las fracciones de los 10 eyaculados sexados de los tres procedimientos: BSA, Sephadex y Ficoll al igual que de sus respectivos controles. Ensayándose en total 100 extracciones (10 controles, 10 fracciones del gradiente de BSA, 40 fracciones de las columnas de Sephadex y 40 fracciones del gradiente de Ficoll-Diatrizoato).

La concentración de todas las muestras fue ajustada a 40ng/ μ l para las reacciones de PCR-tr y PCR o almacenadas a -20 $^{\circ}$ C para su posterior procesamiento

4.2.3 PCR a tiempo real

El PCR en tiempo real es un método que permite monitorear la amplificación de la muestra mediante el empleo de un fluorocromo que se intercala en la doble hélice de ADN, de forma que al producirse cada copia se genera fluorescencia que es detectada por el equipo. Dicha fluorescencia esta relacionada directamente con el número de copias de ADN obtenido en cada ciclo del PCR. El número de copias al inicio de la reacción se puede cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (Ct) que es el parámetro fundamental en una PCR en Tiempo Real y en función del cual se van a realizar todos los cálculos analíticos y obtención de resultados. El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un

aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de copias de la muestra.

Para este ensayo se utilizó el ADN extraído de los espermatozoides de los eyaculados 1 y 2. Del eyaculado 1 se incluyeron todas las fracciones. Del eyaculado 2 se omitieron las fracciones de Sephadex. Se trabajaron en total 16 fracciones (10 del eyaculado 1: control, 1 fracción del gradiente de BSA, 4 fracciones de Sephadex, 4 fracciones del gradiente de Ficoll.Diatrizoato; 6 del eyaculado 2: control, 1 fracción del gradiente de BSA, 4 fracciones del gradiente de Ficoll - Diatrizoato). Se corrieron los controles respectivos de cada eyaculado. Cada muestra se corrió por triplicado.

Las reacciones se realizaron en placas de reacción con calidad óptica para PCR de 96 pozos. Las reacciones de amplificación para los genes SRY y β -actina se corrieron en pozos independientes. Para la amplificación se empleó SYBR Green PCR kit (Applied Biosystems, cat. 4304886).

Cada mezcla de reacción de 25 μ l contenía 100 ng del ADN genómico, 1x SYBR Green PCR buffer, 3mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP's (dATP, DCTP, dGTP), 0.4mM dUTP, 1.25 U AmpliTaq Gold, 0.5 U AmpErase UNG, 1 μ M de la mezcla de cebadores (forward y reverse).

Una vez colocada la mezcla de reacción en cada pozo, la placa para PCR fue centrifugada a 1500 rpm por 3 min (Beckman Coulter, Centrifuga Allegra GR) para eliminar las burbujas de aire.

Las condiciones de ciclaje fueron 50°C, 2 minutos; 95°C , 10 minutos y 40 ciclos a 95°C, 15 segundos; 60°C, 1 minuto. Se utilizó un termociclador Abi Prism 7000

Sequence Detection System (Applied Biosystems), el monitoreo se realizó mediante el software Abi Prism 7000 SDS software v. 1.0 (Applied Biosystems).

Se obtuvo el ciclo de umbral (Ct) de cada reacción de PCR-tr. La relación de expresión del gen problema (REGP) con el gen control fue determinado por:

$$REGP = 2^{Ct_{SRY} - Ct_{\beta actina}}$$

Donde,

Ct SRY= Ciclo Umbral del gen SRY

Ct β -actina = Ciclo Umbral del gen β -actina

Los resultados fueron analizados como la relación entre el gen SRY/ β -actina.

4.2.4 PCR de amplificación

Después de analizar los resultados obtenidos con la PCR-tr se analizó la densidad óptica de geles de agarosa para verificar la amplificación del gen problema SYR, utilizando al gen β -actina como control. Las muestras de ADN utilizadas fueron las mismas que se emplearon en el ensayo de PCR-tr: 10 fracciones del eyaculado 1 (control, 1 fracción del gradiente de BSA, 4 fracciones de Sephadex, 4 fracciones del gradiente de Ficoll - Diatrizoato) y 6 fracciones del eyaculado 2 (control, 1 fracción del gradiente de BSA, 4 fracciones del gradiente de Ficoll - Diatrizoato).

Adicionalmente, en un segundo ensayo se realizaron reacciones de PCR de amplificación con el ADN de las fracciones que mostraron tener diferencia con el control: FC, BSA y S4 de algunos de los eyaculados, se empleó además el ADN

de espermatozoides sexados mediante citometría de flujo, donde la fracción enriquecida era la de espermatozoides portadores del cromosoma X.

En un tercer ensayo se seleccionaron las muestras de ADN con concentraciones de 40ng/μl y calidad ≥ 1.5 de la relación 260/280 de cada fracción de interés (Cx, BSA, S4 y FC) de los 10, eyaculados. En este ensayo también se utilizó el ADN de los espermatozoides X sexados por citometría de flujo.

Cada reacción de PCR de 30μl se preparó en microtubos de 0.25 ml. Cada mezcla de reacción de 30 μl contenía 1x PCR buffer (Clontech, cat. S1793), 0.33 mM del mix de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP) (Clontech, cat. 639125), 0.33 μM de la mezcla de cebadores (forward y reverse), 0.33x Titanium™ Taq polimerasa (Clontech, cat. 75831). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C, 1 min; 35 ciclos a 95°C, 30 s; 68°C por 30s, extensión final de 72°C, 3 min (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler).

4.2.6 Electroforesis y densitometría óptica

Los productos de amplificación se verificaron en geles de agarosa al 1.2% diluida en TAE 1x (tris, acetato y EDTA, Bio-Rad, 50X TAE cat. 151-0773) y 5% de bromuro de etidio (a una concentración 10mg/ml) (SIGMA, cat. E8751), empleando como amortiguador de cámara TAE 1x. Cada mezcla de reacción se adicionó con 1μl de amortiguador de muestra (Orange G, SIGMA, cat. O3756) y se cargaron 15 μl de muestra en los pozos del gel. En el primer pozo se cargaron 5 μl de marcadores de peso molecular (1Kb plus ladder, Invitrogen, cat. **10787-026**).

Las muestras se corrieron durante 30 minutos a 120 V empleando una cámara de electroforesis horizontal (CLP, Apollo) conectada a una fuente de poder (Bio-Rad, Power pac 200)

Los geles fueron observados en un transiluminador (Bio-Rad, UV transiluminator 2000) para visualizar los fragmentos de ADN teñidos con EtBr. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Kodak DC 290.

Las imágenes de los geles fueron evaluadas con el sistema de análisis de imágenes ImagJ para determinar la densidad óptica de las bandas de β -actina y SRY y de este modo cuantificar indirectamente los productos amplificados en cada reacción.

4.2.7 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de la densitometría óptica y del PCR de tiempo real fueron evaluados con ANOVA y prueba HSD Tukey cuando las muestras eran del mismo tamaño y por ANOVA y prueba de Tukey – Kramer para muestras de tamaños diferentes. Para la validación estadística de los experimentos se utilizó el programa BioStat® 2007.

IV. Resultados

Sexaje

De los 10 eyaculados empleados para los 3 procedimientos de sexaje (gradientes de BSA, columnas de Sephadex y gradientes de Ficoll - Diatrizoato) se obtuvieron 90 fracciones: 10 fracciones resultantes de la separación en columnas de BSA, 40 fracciones de la separación en columna de Sephadex y 40 fracciones de la separación en gradiente de Ficoll - Diatrizoato. Además de los 10 controles respectivos (semen lavado sin sexar), trabajándose un total de 100 muestras.

Gradientes de BSA

Después de la segunda centrifugación se recuperó una pastilla celular con una concentración de $13.39 \pm 3.61 \times 10^6$ células/ml lo que representó aproximadamente la mitad de la concentración inicial de espermatozoides utilizada ($30 \times 10^6 \times 10^6$ células/ml) (ver Cuadro 2). Las pastillas obtenidas se muestran en la figura 1.

Cuadro 1. Concentración espermática de las fracciones obtenidas después de la separación de cada eyaculado en dos gradientes de BSA.

| Eyaculado | Concentración espermática ($\times 10^6$ células/ml) |
|------------|---|
| 1 | 11.03 |
| 2 | 12.08 |
| 3 | 13.13 |
| 4 | 12.08 |
| 5 | 13.13 |
| 6 | 10.50 |
| 7 | 8.93 |
| 8 | 19.95 |
| 9 | 13.65 |
| 10 | 19.43 |
| Promedio | 13.39 |
| Desv. Est. | 3.61 |

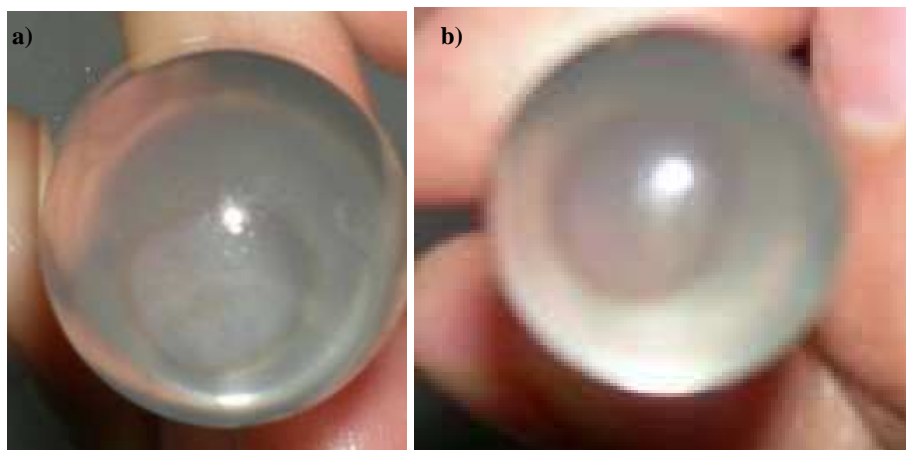


Figura 1. Tubos de ensaye mostrando en el fondo las pastillas de células espermáticas resultantes después de la centrifugación en el gradiente de albúmina. a) Pastilla obtenida de la primera centrifugación. b) Pastilla obtenida después de centrifugar la pastilla recuperada de la primera centrifugación.

Columnas de Sephadex

De cada uno de los 10 eyaculados se obtuvieron 4 fracciones de 1ml, que fueron identificadas como S1, S2, S3 y S4, según el orden de recuperación. En total se obtuvieron 40 fracciones.

El promedio de la concentración de las tres primeras fracciones fue muy similar (S1= 123.38 \pm 71.09, S2= 122.77 \pm 83.33, S3= 103.00 \pm 69.47 células/ml) en cambio en la última fracción colectada la concentración fue notablemente menor (S4= 82.75 \pm 60.79 $\times 10^6$ células/ml) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Concentración espermática de las fracciones obtenidas después de la separación de cada eyaculado en columnas de Sephadex G50.

| Eyaculado | Concentración espermática ($\times 10^6$ células/ml) | | | |
|------------|---|--------|--------|--------|
| | S1 | S2 | S3 | S4 |
| 1 | 91.88 | 137.03 | 55.65 | 34.13 |
| 2 | 151.20 | 147.00 | 99.23 | 43.13 |
| 3 | 65.10 | 13.65 | 55.65 | 66.68 |
| 4 | 156.45 | 40.95 | 83.48 | 71.93 |
| 5 | 30.98 | 5.00 | 1.58 | 18.90 |
| 6 | 267.22 | 232.58 | 214.20 | 86.63 |
| 7 | 32.03 | 252.00 | 204.75 | 153.82 |
| 8 | 139.65 | 128.10 | 72.97 | 128.10 |
| 9 | 148.05 | 128.10 | 165.90 | 201.60 |
| 10 | 151.20 | 143.33 | 76.65 | 22.56 |
| Promedio | 123.38 | 122.77 | 103.00 | 82.75 |
| Desv. Est. | 71.09 | 83.33 | 69.47 | 60.79 |

Gradientes de Ficoll-Diatrizoato

Después de la centrifugación en el gradiente de Ficoll – Diatrizoato se observó la formación de 3 bandas y una pastilla celular, las cuales se recuperaron por aspiración. (Figura 2).

La primera banda fue denominada FA, la cual fue la más delgada y la concentración celular fue de 9.97 \pm 12.64 $\times 10^6$ células/ml; en tres de los eyaculados no se pudo determinar la concentración espermática de esta banda (Cuadro 4).

La siguiente banda fue la más ancha y se denominó FB, y fue dividida en dos subfracciones, FB1 y FB2, esto debido a que se notaba una separación entre ambas. La fracción FB1 en promedio tuvo una concentración de $54.91 \times 10^6 \pm 29.39$ células/ml, mientras que la fracción FB2 tuvo una concentración promedio de $13.44 \pm 7.33 \times 10^6$ células/ml (Cuadro 4).

Cabe mencionar que debido a la cercanía de la banda FA con la banda FB1 al momento de la aspiración de las muestras se llegó a mezclar una con la otra.

La pastilla de células identificada como fracción FC fue la que tuvo una concentración promedio de $61.97 \pm 33.80 \times 10^6$ células/ml (ver Cuadro 4)-

Cuadro 3 Concentración espermática de las fracciones obtenidas después de la separación de cada eyaculado en un gradiente de Ficoll-Diatrizoato.

| Eyaculado | Concentración espermática ($\times 10^6$ células/ml) | | | |
|------------|---|--------|-------|--------|
| | FA | FB1 | FB2 | FC |
| 1 | 2.63 | 7.35 | 19.95 | 144.37 |
| 2 | 32.00 | 27.83 | 8.93 | 35.18 |
| 3 | 0.00 | 63.00 | 26.78 | 40.62 |
| 4 | 0.00 | 88.20 | 17.33 | 36.23 |
| 5 | 0.00 | 102.90 | 14.70 | 35.70 |
| 6 | 4.20 | 23.63 | 4.20 | 59.85 |
| 7 | 9.98 | 50.40 | 2.63 | 65.10 |
| 8 | 30.97 | 71.40 | 11.55 | 70.55 |
| 9 | 2.10 | 54.06 | 17.33 | 45.50 |
| 10 | 7.87 | 60.38 | 11.03 | 86.63 |
| Promedio | 9.97 | 54.91 | 13.44 | 61.97 |
| Desv. Est. | 12.64 | 29.39 | 7.33 | 33.80 |

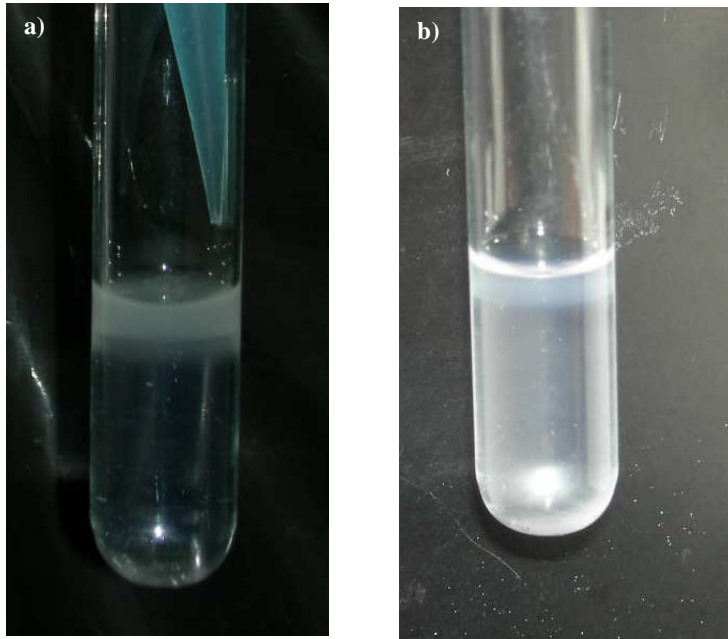


Figura 2. Tubos de ensayo mostrando el gradiente de Ficoll – Diatrizoato de Sodio. a) La columna antes de ser centrifugada, el medio se observa translúcido y en la superficie una banda bien definida que corresponde a la muestra colocada en la superficie. B) La misma columna después del proceso de centrifugación, se observa el medio turbio ya que se han formado las distintas bandas.

Validación

Tinción con quinacrina

Para este ensayo se utilizó una muestra de espermatozoides control elegida al azar, ajustando la concentración a 30×10^6 células/ml. Los espermatozoides fueron descondensados y teñidos con quinacrina hidroc্লorada a distintos tiempos (1, 2, 3, 4, y 5 horas). En ninguno de los espermatozoides teñidos a los diferentes tiempos se observó un punto fluorescente (cuerpo Y) bien definido indicativo de la presencia del cromosoma Y en las cabezas espermáticas (Figura 3).

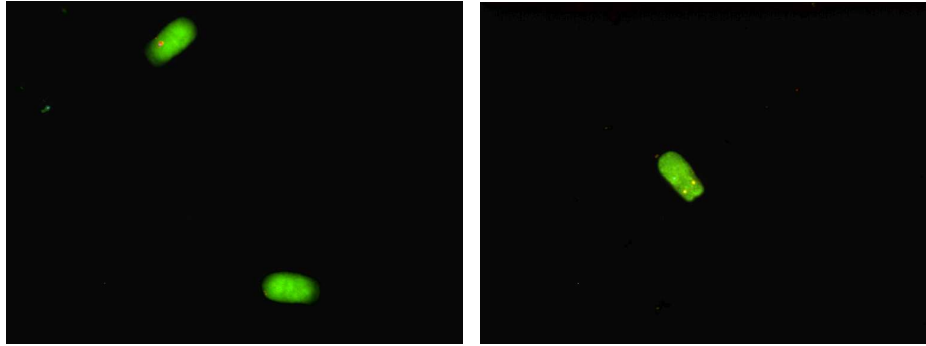


Figura 3. Microscopia de Fluorescencia de espermatozoides de bovino teñidos con quinacrina. Se observa tinción homogénea de las cabezas, negativas al cuerpo Y.

Hibridación *in situ*

Marcaje de la Sonda

Un primer paso para la amplificación de la sonda fue la obtención de fragmentos purificados del gen BRY.1 del cromosoma Y bovino. Para ello se realizó un gradiente en el cual se probaron 5 temperaturas de alineación de los cebadores y 3 concentraciones de $MgCl_2$. El gel de los productos amplificados mostró que la cantidad de producto obtenido a las temperaturas de 56,58, 60, 62 °C fue muy similar, mientras que a 64°C la amplificación fue menos eficiente. Por otro lado se observó que la concentración de 1 mM de $MgCl_2$ fue la menos eficiente, siendo muy semejante el producto amplificado a las concentraciones de 1.5 y 2.0 mM (Figura 4).

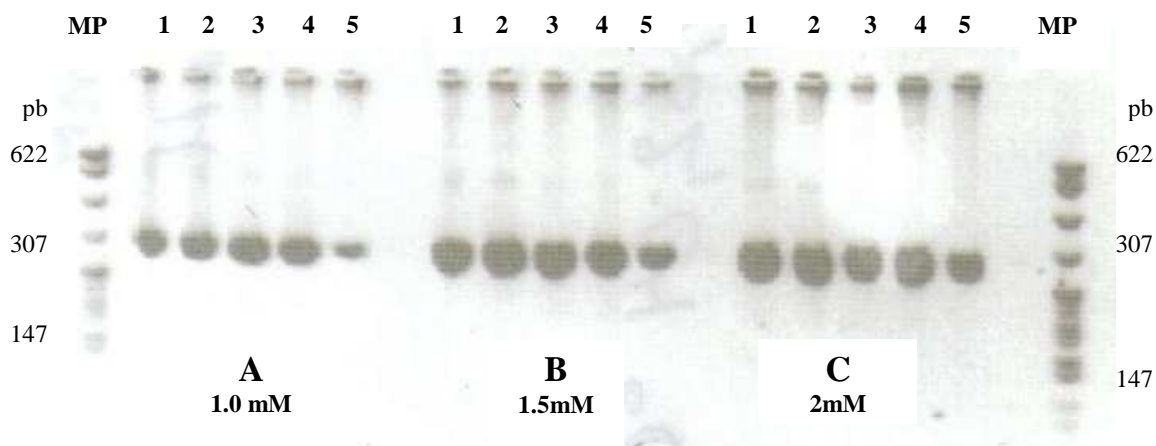


Figura 4. Gel de agarosa al 3% mostrando los productos de amplificación del gen BRY.1 bajo diferentes condiciones. Cada bloque (A, B, C) corresponde a las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ probadas: A= 1.0 mM, B= 1.5mM y C= 2 mM; Los números de 1-5 corresponde a las temperaturas de alineación: 1= 56°C, 2= 58°C, 3=60° C, 4=62°C, 5=64°C. MP=marcadores de peso.

En la figura 5 se presentan los productos de la PCR que fueron purificados a partir del gel de los productos amplificados.

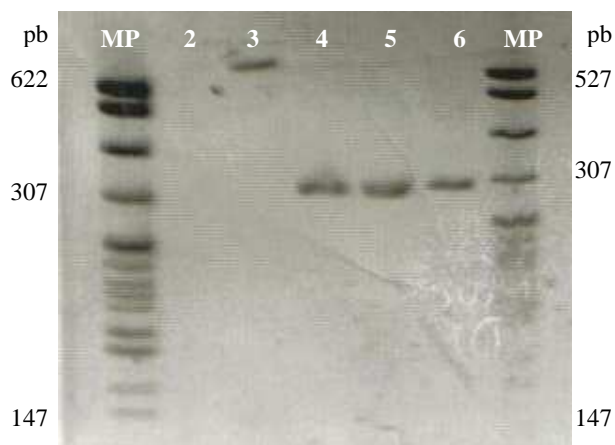


Figura 5. Gel de agarosa al 3% mostrando los productos purificados a partir un gel de amplificación. En el carril 2 no se observa ningún producto. En el carril 3 se observa un producto inespecífico. En los carriles 4, 5 y 6 se observan bandas bien definidas que corresponden a BRY.1.

Con el fin de obtener un fragmento marcado del cromosoma Y bovino, se emplearon dos técnicas de marcaje: PCR de amplificación y random priming.

En ambos procedimientos se observó amplificación del control positivo (Figura 6 carril 3 y 4, Figura 7 carril 2), sin embargo en los carriles correspondiente a los productos marcados con el fluorocromo (Figura 6 carril 2, Figura 7 carril 3) se observaron dos bandas anchas las cuales no correspondieron al peso de los productos de BRY.1 (307 pb). Mas aún, después de la purificación de los productos marcados por columna de Sephadex, no se observó ninguna banda de amplificación de la sonda marcada con fluorescencia, e inclusive ya no se observaron las bandas observadas en los geles anteriores (datos no mostrados), por otra parte la columna de Sephadex adquirió color rosáceo posiblemente por el fluorocromo retenido.

Cabe señalar que de los ensayos realizados modificando la concentración del nucleótido marcado, en ningún caso el nucleótido marcado se incorporó a la sonda (Figura 8).

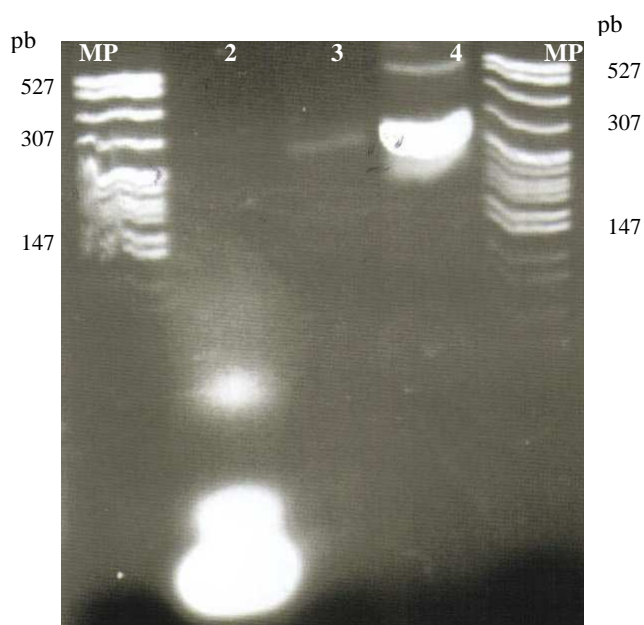


Figura 6. Gel de agarosa al 3 % que muestra los productos de la amplificación de BRY.1 y marcaje con dUTP-rodamina mediante PCR de amplificación. El carril 2 corresponde a la amplificación de BRY.1 empleando dUTP-rhodamina omitiendo el dTTP Se observa una banda de intensa fluorescencia que sobrepasa al marcador, corresponde a los nucleótidos fluorescentes que no se incorporaron. En el carril 3 se redujo la concentración de dTTP y no se utilizó dUTP-rodamina se observa una banda delgada y de poca intensidad de 300 pb que corresponde a la amplificación de BRY.1. En el carril 4 el producto de amplificación de BRY.1, en esta reacción se utilizó dTTP a la misma concentración que el resto de los nucleótidos, se observa una banda ancha muy intensa de 300 pb y una banda delgada que corresponde a algún producto inespecífico. MP= marcadores de peso.



Figura 7. Gel de agarosa al 3% que muestra los productos de la amplificación y marcaje de BRY.1 dUTP-rodamina mediante random priming. En el carril 2 se observa el producto de la reacción en el que se redujo la concentración de dTTP y no se utilizó dUTP-rodamina, se observa una banda delgada de escasa fluorescencia a la altura de 300 pb. El carril 3 corresponde al producto de la reacción en el cuál se redujo la concentración de dTTP y se incluyó el dUTP-rodamina, no se observa producto a la altura de 300 pb que correspondería a BRY.1, la mancha de intensa fluorescencia corresponde a los nucleótidos no incorporados en la reacción. MP= marcadores de peso.

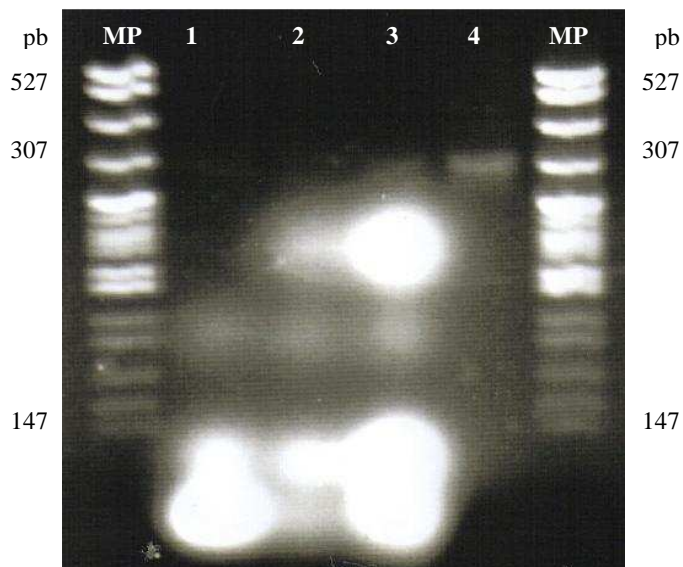


Figura 8. Gel de agarosa al 3% que muestra los productos de la reacción de PCR de amplificación. En los carriles 1-3 se ensayó anulando completamente el nucleótido d-TTP y se probaron 3 concentraciones de dUTP-rodamina: en el carril 1 1nM, en el carril 21.5 nM, en el carril 3 2 nM. En ninguno de los 3 casos se observa banda correspondiente a 300 pb y se observan manchas muy intensas correspondientes a los nucleótidos no incorporados. En el carril 4 no se utilizó dUTP-rodamina y se utilizó una concentración reducida de dTTP, se observa una banda delgada de intensidad inferior a la del marcador. MP= marcadores de peso.

Independientemente de la aparente falta de incorporación del nucleótido marcado a la sonda del gen BRY.1 bovino, los productos de las reacciones fueron empleados en los ensayos de hibridación *in situ*

Descondensación

Para descondensar el núcleo espermático, los frotis de los espermatozoides fueron tratados con dos procedimientos, el efecto de la descondensación fue evaluado por la tinción del ADN con fluorocromo DAPI.

Los espermatozoides tratados con DTT 100 mM y Heparina (100 U/ml) mostraron escaso o nulo incremento en el diámetro del núcleo espermático en comparación con los espermatozoides no tratados (Cx= control) (Figura 9). En cambio los espermatozoides previamente desmembrados y descondensados con DTT 100 mM y Heparina 100 U/ml mostraron franca descondensación a los dos tiempos ensayados observándose incremento en el tamaño y cambio de la forma de la cabeza espermática en comparación con los espermatozoides no tratados (Figura 10); sin embargo no se observó diferencia entre los dos tiempos de incubación ensayados.

Hibridación in situ

Se utilizaron frotis de espermatozoides de una muestra control seleccionada al azar, como control positivo en cada ensayo se incluyeron frotis de linfocitos de bovino (macho) de cromosomas mitóticos. En ninguno de los ensayos realizados se observó señal de hibridación, tanto en las muestras de linfocitos como en las de espermatozoides (Figura 11).

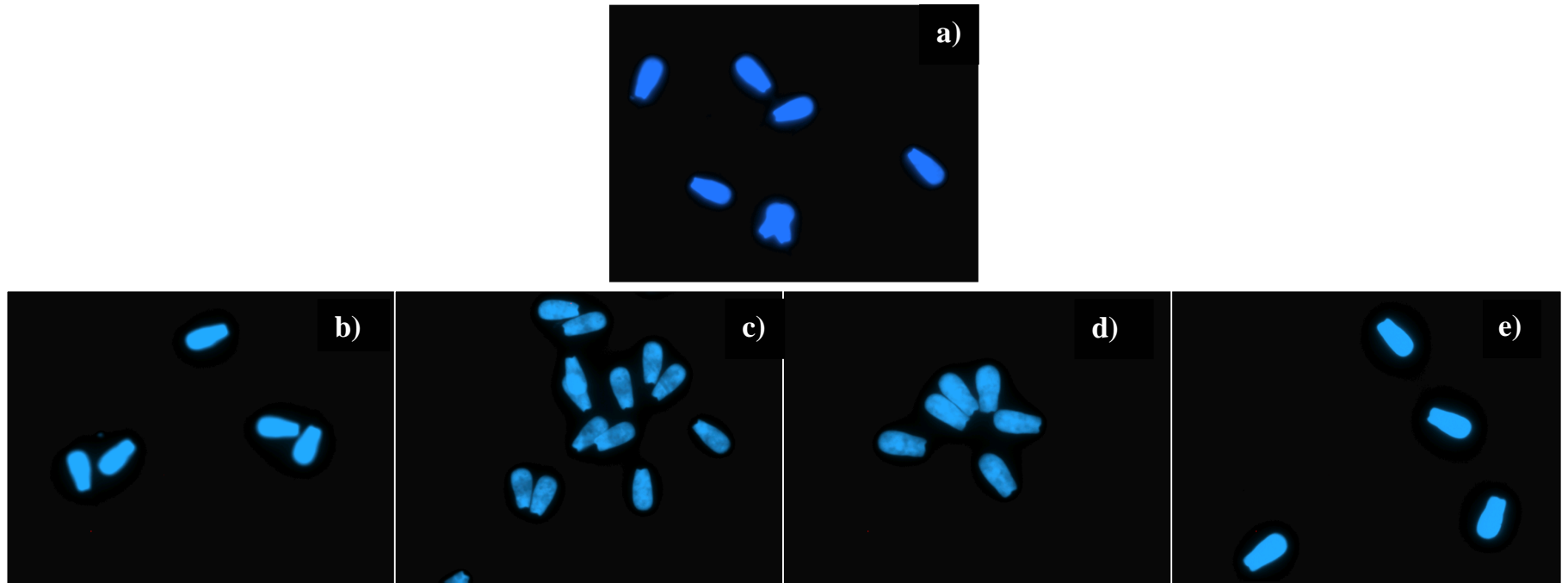


Figura 9. Núcleos de espermatozoides de bovino teñidos con DAPI después de ser tratados con DTT 100 mM y Heparina 10 U/ml a diferentes tiempos. a) Control (espermatozoides sin tratamiento) b) 15 min, c) 20, d) 25 min, e) 40 min.. Se observa escaso aumento en el diámetro del núcleo con respecto al control, lo cual indica un bajo grado de descondensación

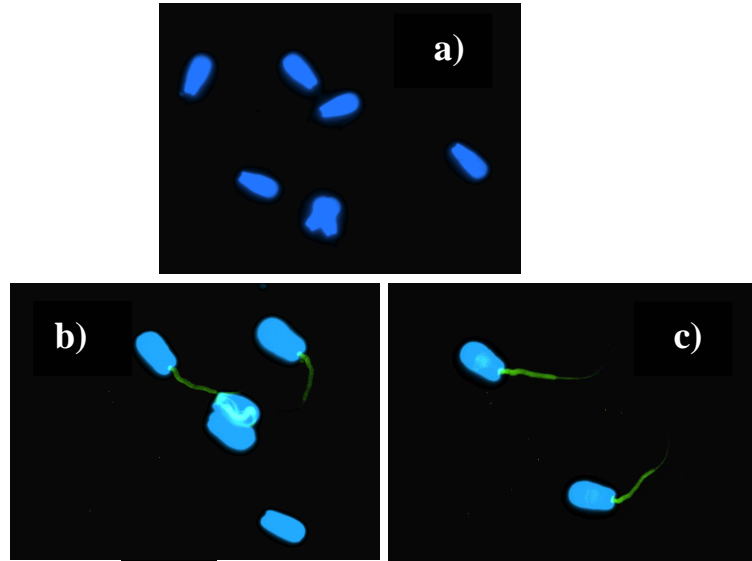


Figura 10. Núcleos de espermatozoides de bovino teñidos con DAPI después de ser desmembrados con el detergente Brij 30T al 1.2% y descondensados con DTT 100 mM y Heparina 10 U/ml a diferentes tiempos: a) Control b) 15 min, c) 20. El control corresponde a espermatozoides sin tratamiento. En b) y c) se observa franco incremento en el diámetro de los núcleos con respecto al control lo cual indica franca descondensación, adecuada para los ensayos de hibridación *in situ*. No se observa diferencia entre los dos tiempos probados.

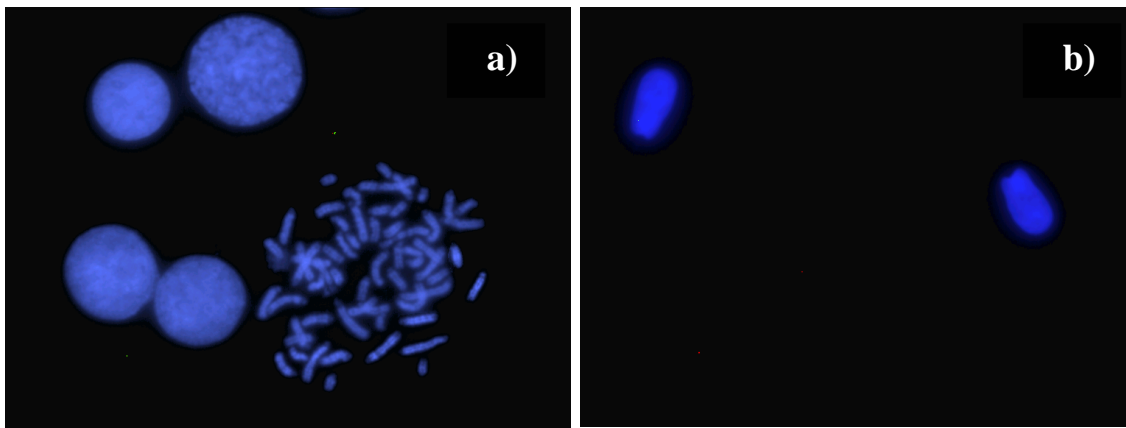


Figura 11. Ensayo de hibridación *in situ*. a) Núcleos de linfocitos y cromosomas de linfocitos en metafase de bovino b) núcleos de espermatozoides de bovino, en los que se utilizó la sonda del gen BRY.1 del cromosoma Y de bovino marcada con dUTP-rodamina. En ambos casos no hubo la señal de hibridación de la sonda marcada.

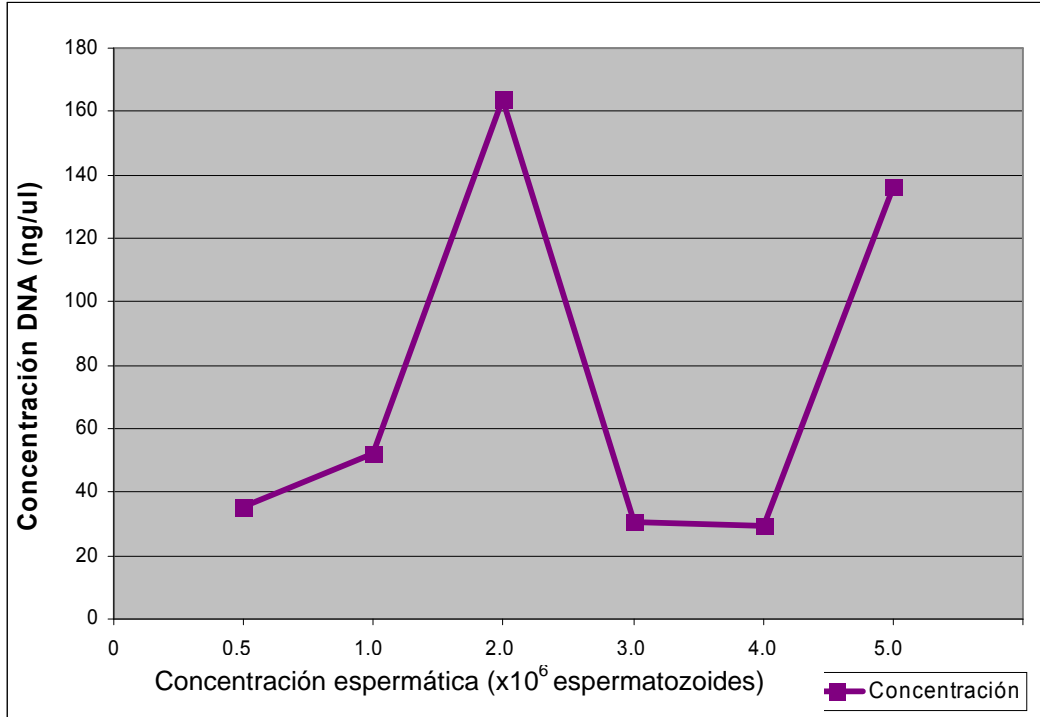
Análisis de ADN

Obtención de ADN

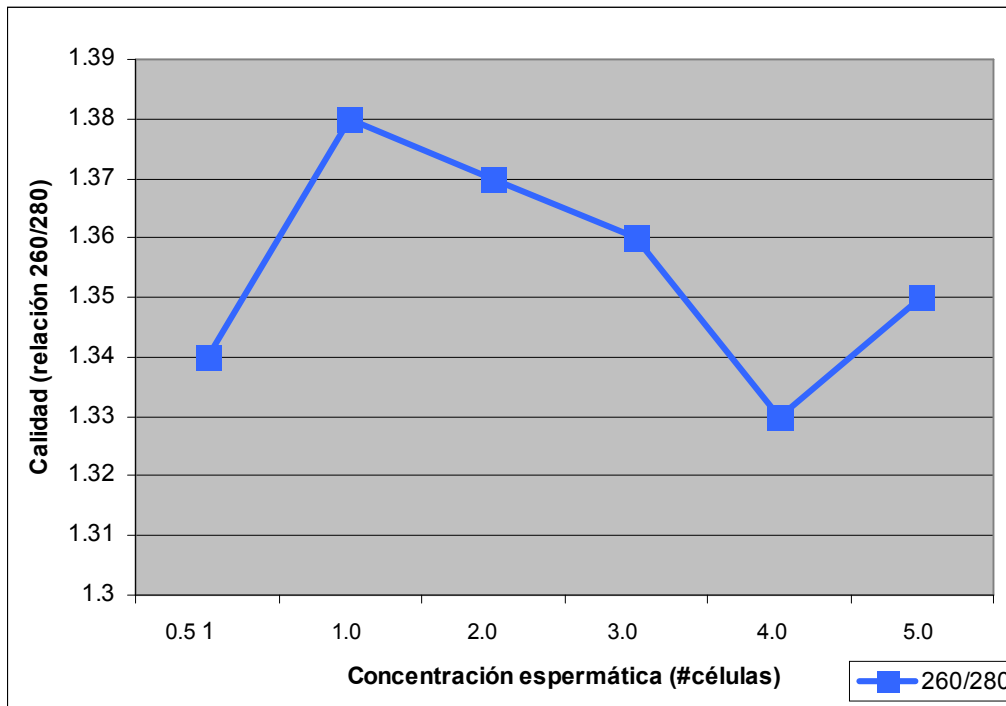
Los resultados para determinar la concentración espermática para la extracción de ADN se muestran en la Cuadro 5. Como se puede observar, la concentración con la que se obtuvo la mayor calidad de muestra fue la de 1×10^6 células, la cual se utilizó para las extracciones subsecuentes. En la Gráfica 1 se observa claramente que al incrementar la concentración de células también incrementó la concentración de ADN obtenido, sin embargo con las concentraciones de 3, 4 y 5 $\times 10^6$ células la concentración de ADN descendió drásticamente. Aunque la calidad del ADN fue constante, no se obtuvo el mínimo requerido para los ensayos de PCR-tr ($260/280 \geq 1.5$) (Gráfica 2)

Cuadro 4. Concentración y calidad del ADN extraído de los espermatozoides de toro con el método de cloroformo a diferentes concentraciones de la muestra

| Concentración ($\times 10^6$ espermatozoides) | Concentración del ADN (ng/ μ l) | Calidad del ADN (260/280) |
|--|-------------------------------------|---------------------------|
| 0.5 | 35.23 | 1.34 |
| 1 | 51.95 | 1.38 |
| 2 | 163.80 | 1.37 |
| 3 | 30.50 | 1.36 |
| 4 | 29.30 | 1.33 |
| 5 | 136.30 | 1.35 |



Gráfica 1. Concentración de ADN de espermatozoides de toro extraído por el método de extracción con proteinasa K y cloroformo.



Gráfica 2. Calidad del ADN de espermatozoides de toro obtenido con el método de extracción con proteinasa K y cloroformo.

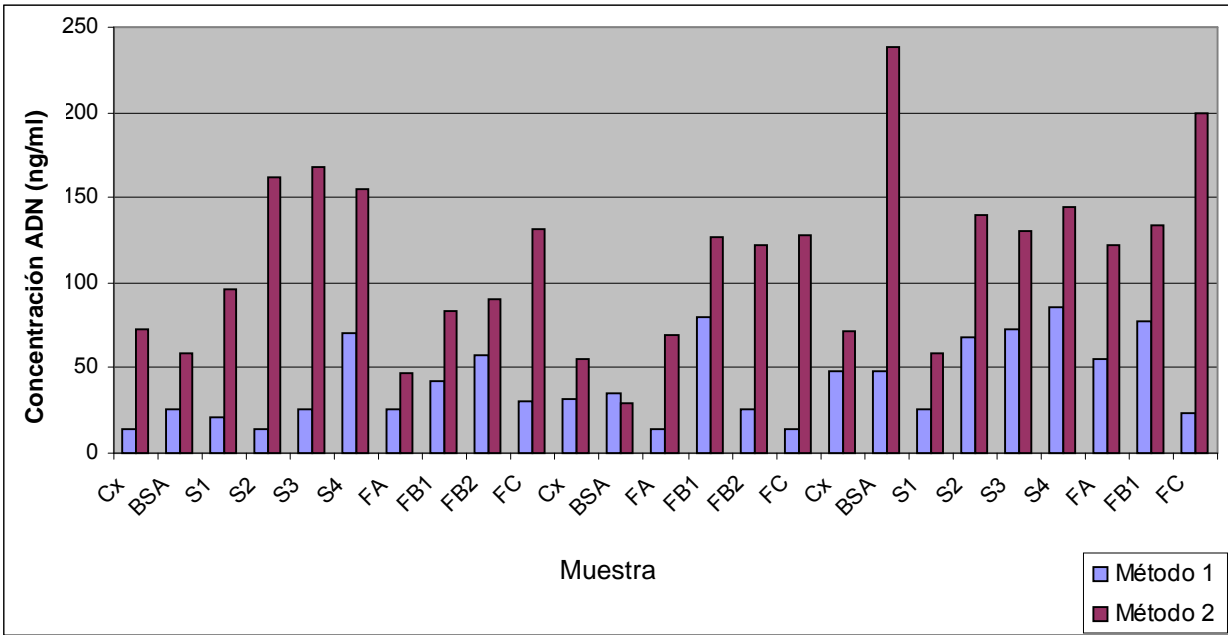
En la Cuadro 6 se muestran los resultados para la extracción de ADN, con los dos métodos empleados, de los espermatozoides sexados de los eyaculados 1, 2 y 9 (sexados con los tres métodos de separación).

Como se puede apreciar empleando el método 1 (proteínasa K y cloroformo) la concentración promedio (41.4 ± 23.3) y la calidad del ADN promedio (1.3 ± 0.2) de las muestras ensayadas no cumplieron con los valores requeridos para su uso en las reacciones de PCR (≥ 40 ng/ μ l y 1.5 respectivamente), En cambio los espermatozoides tratados con el método 2 (papaína y DTT) mostraron en promedio una concentración (113.3 ± 50.6) y calidad de ADN adecuados (1.7 ± 0.2).

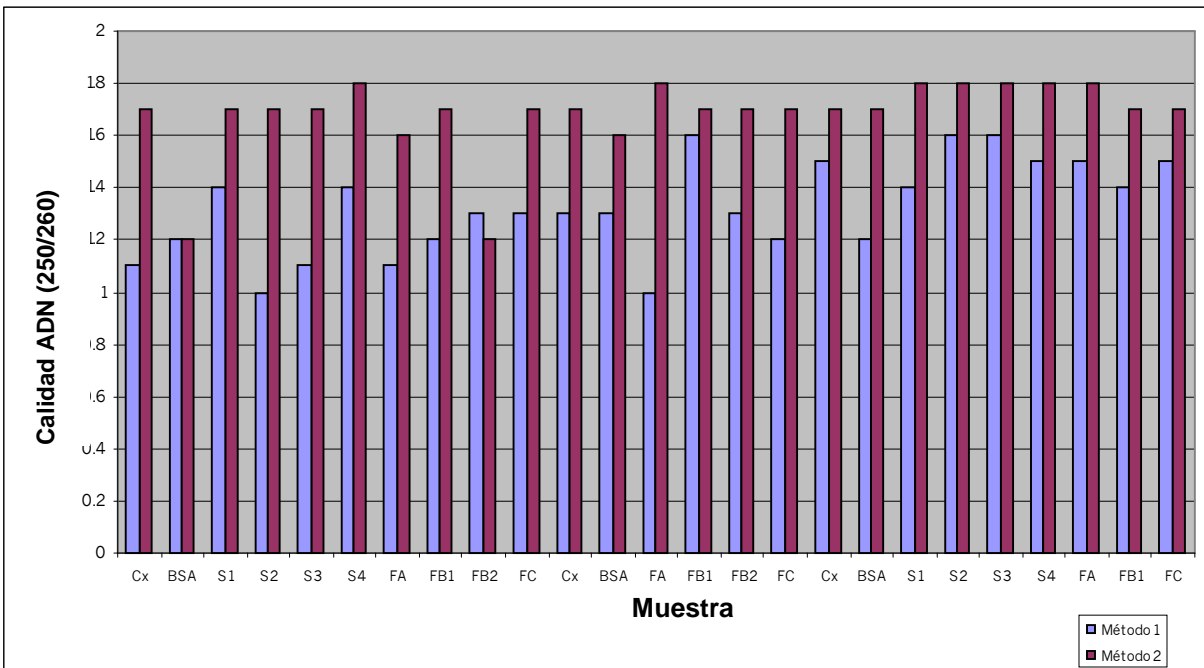
En la grafica 3 y 4 se comparan la calidad y concentración de los dos métodos de extracción ensayados.

Cuadro 5. Comparación de la concentración y la calidad del ADN extraído de espermatozoides de bovino con dos métodos de extracción y purificación de ADN.

| Ensayo | Muestra | Método 1 | | Tratamiento 2 | |
|--------|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | | Calidad del ADN (260/280) | Concentración del ADN (ng/μl) | Calidad del ADN (260/280) | Concentración del ADN (ng/μl) |
| 1 | Cx | 1.1 | 14.2 | 1.7 | 72.3 |
| 1 | BSA | 1.2 | 25.7 | 1.2 | 58.4 |
| 1 | S1 | 1.4 | 21.7 | 1.7 | 95.9 |
| 1 | S2 | 1.0 | 14.2 | 1.7 | 162.3 |
| 1 | S3 | 1.1 | 26.4 | 1.7 | 167.5 |
| 1 | S4 | 1.4 | 70.9 | 1.8 | 155.1 |
| 1 | FA | 1.1 | 25.4 | 1.6 | 47.1 |
| 1 | FB1 | 1.2 | 42.4 | 1.7 | 83.5 |
| 1 | FB2 | 1.3 | 58.0 | 1.2 | 90.1 |
| 1 | FC | 1.3 | 30.5 | 1.7 | 131.7 |
| 2 | Cx | 1.3 | 31.8 | 1.7 | 54.6 |
| 2 | BSA | 1.3 | 35.6 | 1.6 | 28.9 |
| 2 | FA | 1.0 | 14.2 | 1.8 | 69.8 |
| 2 | FB1 | 1.6 | 79.8 | 1.7 | 127.3 |
| 2 | FB2 | 1.3 | 25.4 | 1.7 | 122.1 |
| 2 | FC | 1.2 | 13.6 | 1.7 | 128.4 |
| 9 | Cx | 1.5 | 47.9 | 1.7 | 71.6 |
| 9 | BSA | 1.2 | 47.9 | 1.7 | 238.2 |
| 9 | S1 | 1.4 | 25.7 | 1.8 | 58.4 |
| 9 | S2 | 1.6 | 67.7 | 1.8 | 139.9 |
| 9 | S3 | 1.6 | 72.8 | 1.8 | 130.5 |
| 9 | S4 | 1.5 | 86.2 | 1.8 | 144.5 |
| 9 | FA | 1.5 | 55.4 | 1.8 | 122.2 |
| 9 | FB1 | 1.4 | 77.3 | 1.7 | 134.2 |
| 9 | FC | 1.5 | 23.9 | 1.7 | 199.4 |
| | Promedio | 1.3 | 41.4 | 1.7 | 113.3 |
| | Desv. Est. | 0.2 | 23.3 | 0.2 | 50.6 |
| | Max | 1.6 | 86.2 | 1.8 | 238.2 |
| | Min | 1.0 | 13.6 | 1.2 | 28.9 |



Gráfica 3. Concentración de ADN extraído de espermatozoides de toro. Comparación del método de extracción 1 (proteinasas K y cloroformo) y 2 (papaína y DTT). Se observa que el método 2 es más eficiente ya que la concentración de ADN extraído es superior a la obtenida con el método 1.



Gráfica 4. Calidad del ADN extraído de espermatozoides de toro. Comparación del método de extracción 1 (proteinasas K y cloroformo) y 2 (papaína y DTT). Se observa que el ADN extraído con el método 2 tiene mayor calidad y que hay menor fluctuación entre los ensayos, siendo los valores constantes.

Para los ensayos de PCR de amplificación y PCR-tr, el ADN de las 100 fracciones fue extraído mediante el segundo método seleccionándose sólo las muestras de ADN de aquellas fracciones cuya concentración y calidad estuviera dentro del valor de referencia (≥ 40 ng/ μ l y 1.5 respectivamente)

PCR tiempo real

Se realizó un estudio molecular, a través de PCR-tr, para evaluar la amplificación del SRY presente exclusivamente en los espermatozoides portadores del cromosoma Y y compararlo con la amplificación del gen para β -actina presente en todos las células ya que es una secuencia autosómica.

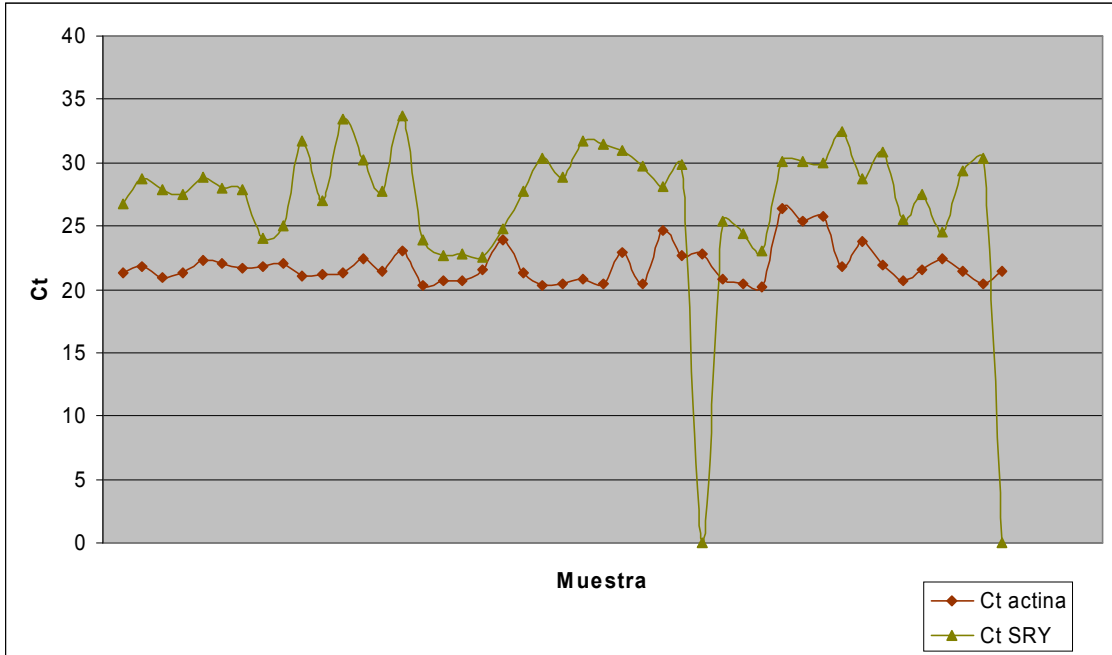
Para este ensayo se utilizó el ADN extraído de los espermatozoides de los eyaculados 1 y 2. Para el eyaculado 1 se extrajo el ADN de las muestras control, y las obtenidas de los diferentes métodos de separación. En el caso del eyaculado 2 se excluyeron las fracciones obtenidas de las columnas de Sephadex.

Los resultados obtenidos se muestran en la Cuadro 7 y gráficas 5.

Cuadro 6. Valores Ct de las muestras analizadas mediante PCR-tr para el gen β -actina y SRY.

| Ensayo | Muestra | Ct SRY | Ct β -Actina |
|--------|---------|---------|--------------------|
| 1 | Cx | 26.7702 | 21.2506 |
| | | 28.7521 | 21.7577 |
| | | 27.8532 | 20.8741 |
| 1 | BSA | 27.4753 | 21.3171 |
| | | 28.8752 | 22.325 |
| | | 27.9455 | 22.0621 |
| 1 | S1 | 27.8309 | 21.7311 |
| | | 24.0532 | 21.8293 |
| | | 25.0309 | 22.0764 |
| 1 | S2 | 31.7308 | 21.023 |
| | | 27.0009 | 21.1467 |
| | | 33.3958 | 21.2759 |
| 1 | S3 | 30.1669 | 22.3633 |
| | | 27.7538 | 21.4604 |
| | | 33.7342 | 23.0274 |
| 1 | S4 | 23.8844 | 20.2584 |
| | | 22.6922 | 20.695 |
| | | 22.7336 | 20.6854 |
| 1 | FB1 | 22.4945 | 21.4906 |
| | | 24.7462 | 23.8699 |
| | | 27.7299 | 21.3418 |
| 1 | FB2 | 30.2939 | 20.3309 |
| | | 28.9062 | 20.4229 |
| | | 31.7243 | 20.8076 |
| 1 | FC | 31.4678 | 20.428 |
| | | 31.0173 | 22.9685 |
| | | 29.7656 | 20.414 |
| 2 | Cx | 28.0754 | 24.674 |
| | | 29.8574 | 22.6257 |
| | | ND | 22.7365 |
| 2 | BSA | 25.3539 | 20.8066 |
| | | 24.4556 | 20.484 |
| | | 23.0848 | 20.2087 |
| 2 | FA | 30.0689 | 26.4121 |
| | | 30.0704 | 25.3835 |
| | | 30.0083 | 25.7561 |
| 2 | FB1 | 32.4545 | 21.7379 |
| | | 28.7625 | 23.7946 |
| | | 30.8817 | 21.8842 |
| 2 | FB2 | 25.4619 | 20.7381 |
| | | 27.4829 | 21.5309 |
| | | 24.5331 | 22.3981 |
| 2 | FC | 29.3774 | 21.3824 |
| | | 30.3705 | 20.395 |
| | | ND | 21.3998 |

ND – valores no determinados.



Gráfica 5. Valores Ct para el gen β -actina y SRY

Como se observa los valores Ct para el gen SRY fueron mayores que los valores Ct del gen β -actina, lo cual indica que se requirió un mayor número de ciclos para detectar la fluorescencia emitida por la amplificación del gen SRY.

También se puede observar que los valores Ct para el gen β .actina, fueron muy similares en todas las muestras por lo que se puede decir que el número de copias fue similar en todos los ensayos realizados. Por otro lado los valores Ct para SRY fueron variables entre cada muestra, lo cual indica que el número de copias del gen SRY en cada muestra es diferente.

Al determinar la diferencia en el número de copias del gen SRY con respecto al número de copias del gen β -actina, mediante la relación de los promedios de los Ct de la amplificación de SRY entre los de β -actina para cada muestra. Al realizar el análisis estadístico se promediaron los valores de las fracciones que fueron incluidas dos veces (control, BSA, FA, FB1, FB2, FC) (Cuadro 8).

Los resultados de la relación de los promedios de los Ct de la amplificación de gen β -actina y SRY para cada muestra se muestran en la Cuadro 8. Como se puede apreciar la fracción FA del eyaculado 1 no pudo ser determinada por el termociclador de tiempo real.

Cuadro 7. Relación de los valores Ct promedio para el gen β -actina y SRY de las muestras analizadas mediante PCR-tr.

| | Eyaculado 1 | Eyaculado 2 |
|------------|--------------------|--------------------|
| Cx | 0.0111 | 0.0203 |
| BSA | 0.0136 | 0.0719 |
| S1 | 0.0738 | ND |
| S2 | 0.0013 | ND |
| S3 | 0.0032 | ND |
| S4 | 0.1699 | ND |
| FA | ND | 0.0545 |
| FB1 | 0.148 | 0.0033 |
| FB2 | 0.0011 | 0.0518 |
| FC | 0.0014 | 0.0022 |

ND=no determinado. S1-S4 del eyaculado 2 no fueron incluidas en el ensayo.

En la Cuadro 9 se presentan los promedios de los valores Ct de cada fracción y las diferencias estadística entre ellas, la prueba de Tukey indicó que no existió diferencia estadísticamente significativa entre las fracciones ($P > 0.05$). Sin embargo debido a que numéricamente el promedio de los valores Ct de la fracción FC fue 8.6 veces menor que el control, lo cual sugiere un posible enriquecimiento de la fracción de espermatozoides portadores de cromosoma X (Cuadro 10).

Cuadro 8. Promedios de la relación de valores Ct promedio para el gen β -actina y SRY de las muestras analizadas mediante PCR-tr ($P \leq 0.05$)

| | Cx | BSA | FB1 | FB2 | FC |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Eyaculado 1 | 0.0111 | 0.0136 | 0.1480 | 0.0011 | 0.0014 |
| Eyaculado 2 | 0.0203 | 0.0719 | 0.0033 | 0.0518 | 0.0022 |
| Promedio | 0.0157 ^a | 0.0428 ^a | 0.0757 ^a | 0.0265 ^a | 0.0018 ^a |
| Devs. Est. | 0.0065 | 0.0412 | 0.1023 | 0.0359 | 0.0006 |

PCR de amplificación y densitometría óptica

Los productos de la amplificación de los genes SRY y β - actina con el ADN de las fracciones empleadas en el ensayo de PCR-tr se presentan en la figura 12. Visualmente se apreció que la intensidad de fluorescencia de las bandas correspondientes a la amplificación del gen β -actina fue superior a la de la amplificación del gen SRY. Sin embargo, el análisis estadístico de los promedios de la densidad óptica de las bandas de cada fracción (control, BSA, FA, FB1, FB2 y FC) no reveló diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los valores de la densidad óptica de cada fracción con respecto al control ($P > 0.05$) (Cuadro 10).

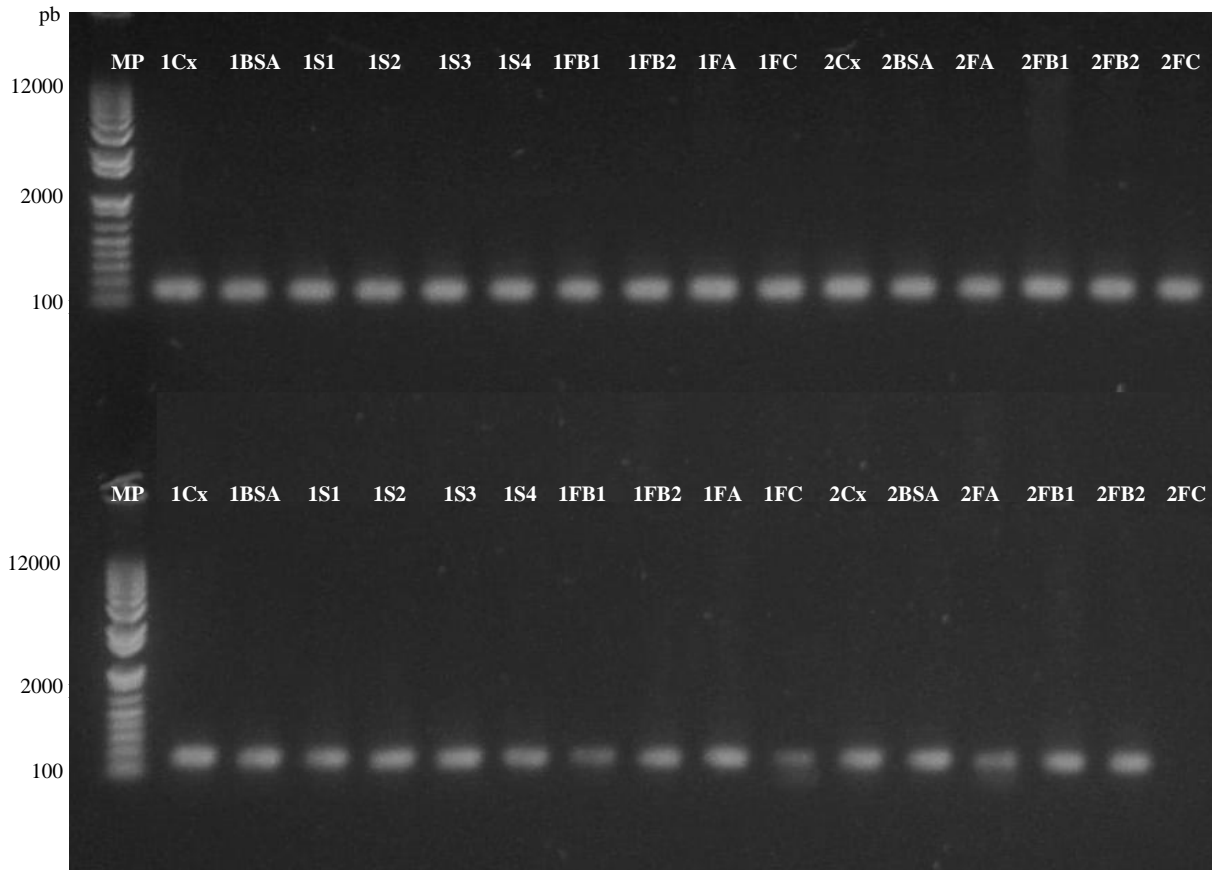


Figura12. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados. Fila superior corresponde a los productos de amplificación del gen β -actina, mientras que la fila inferior corresponde a los productos del gen SRY las muestras son correspondientes. El primer carril en ambos casos corresponde al marcador de peso molecular.

Cuadro 10. ANOVA de la Relación de la densidad óptica de las bandas SRY/ β -actina ($P>0.05$)

| MUESTRA | Cx | BSA | FA | FB1 | FB2 | FC |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Densidad óptica | 1.0331 | 1.0040 | 0.8978 | 0.7940 | 0.8934 | 0.7309 |
| | 0.8812 | 0.9817 | 0.8815 | 0.9104 | 0.9524 | 0.5419 |
| Media | 0.9570 ^a | 0.9930 ^a | 0.8900 ^a | 0.8520 ^a | 0.9230 ^a | 0.6360 ^a |
| Desviación estandar | 0.1070 | 0.0160 | 0.0120 | 0.0820 | 0.0420 | 0.1340 |

Los resultados de una segunda amplificación en los que se utilizaron 4 muestras de la fracción FC, 3 de la fracción control, 3 de la fracción BSA seleccionadas al azar, así como la muestra sexada por citometría de flujo se muestran en la figura 13. También se observan bandas únicas bien definidas, las bandas correspondientes a la amplificación de β -actina se observan más homogéneas en cuanto a su intensidad y grosor, observándose diferencias en las bandas de los productos de SRY. Sin embargo, el análisis estadístico de los promedios de las densidades ópticas de cada fracción indica que no existe diferencia estadísticamente significativa con respecto a la fracción control ($P>0.05$) (Cuadro 11).

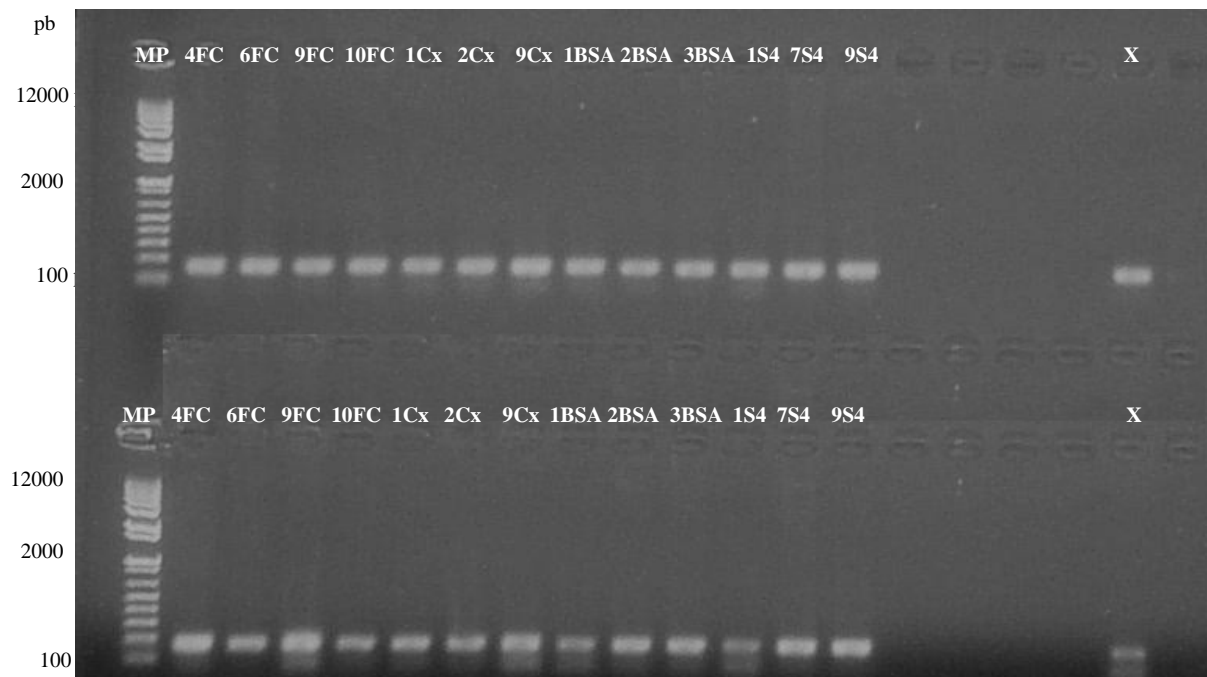


Figura 13. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados. Fila superior corresponde a los productos de amplificación del gen β -actina, mientras que la fila inferior corresponde a los productos del gen SRY las muestras son correspondientes. El primer carril en ambos casos corresponde al marcador de peso molecular.

Cuadro 11. Relación de la densidad óptica entre las bandas SRY/ β -actina. (Réplica 1) (P>0.05).

| | FC | Cx | BSA | S4 | X |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------|
| | 0.9410 | 0.8137 | 0.7568 | 0.7430 | 0.6647 |
| | 0.8013 | 0.7892 | 0.8711 | 0.8651 | 0.6647 |
| | 0.9828 | 0.8571 | 0.8661 | 0.8703 | |
| | 0.7636 | | | | |
| Media | 0.8722 ^a | 0.8200 ^a | 0.8313 ^a | 0.8261 ^a | 0.6647* |
| Desv.Est | 0.1062 | 0.0344 | 0.0646 | 0.0720 | 0.0000 |

*Este valor no fue empleado en el análisis estadístico

En la figura 14 se observan los productos de amplificación de los mismos genes con el ADN de la fracción FC de los eyaculados 1-9, control de los eyaculados 1-6, BSA de los eyaculados 1-7 y la muestra sexada por citometría de flujo (figura 15). Al igual que en los casos anteriores los productos de la amplificación del gen β -actina son homogéneos, mientras que visualmente las bandas de los productos de SRY varían en cuanto a su intensidad. Sin embargo al realizar el análisis estadístico los resultados indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las fracciones (P>0.05) (Cuadro 12).

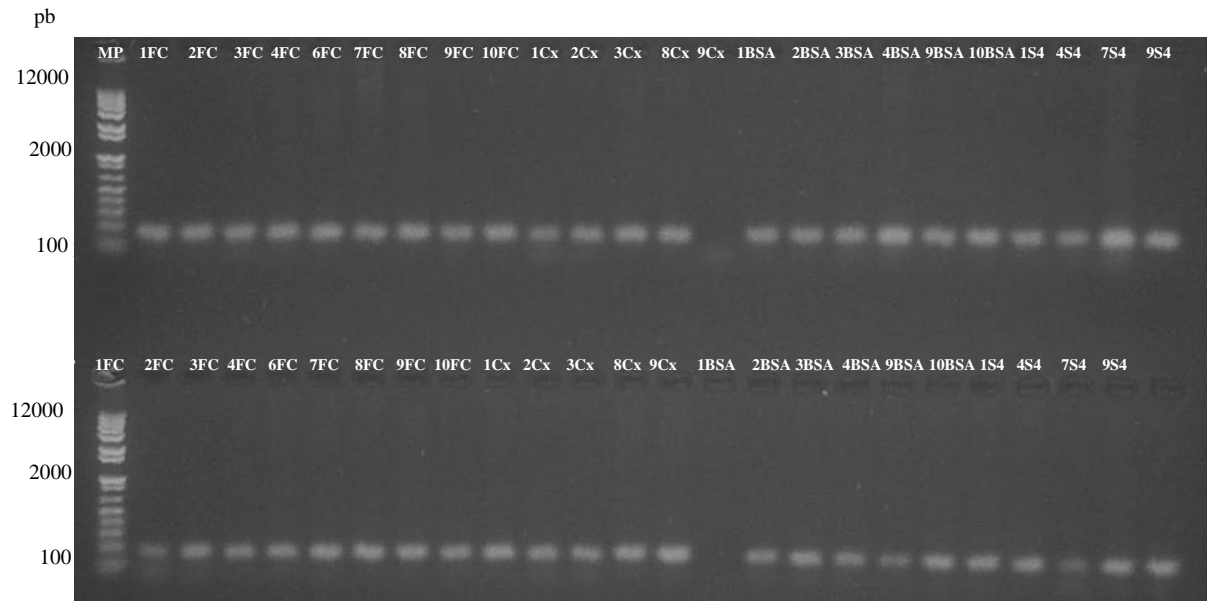


Figura 14. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados. La fila superior corresponde a los productos de amplificación del gen β -actina, mientras que la fila inferior corresponde a los productos del gen SRY, las muestras son correspondientes. El primer carril en ambos casos corresponde al marcador de peso molecular.

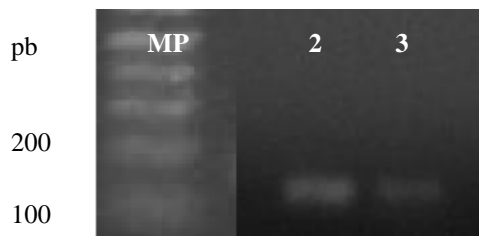


Figura 15. Gel de agarosa al 1% que muestra los productos amplificados a partir del ADN de espermatozoides X sexados por citometría de flujo. El carril 2 corresponde a los productos de amplificación del gen β -actina, mientras que el carril 3 corresponde a los productos del gen SRY. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular.

Cuadro 9. Relación de la densidad óptica de las bandas SRY/ β -actina. (Replica 2) ($P \leq 0.05$).

| | FC | Cx | BSA | S4 | X |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|
| 1 | 0.8608 | 1.0600 | 0.9581 | 0.9627 | 0.7555 |
| 2 | 0.9505 | 0.9962 | 1.0040 | 0.8514 | |
| 3 | 0.9395 | 1.0090 | 0.9146 | 0.8418 | |
| 4 | 0.9524 | 1.0818 | 0.7628 | 0.9288 | |
| 6 | 0.9876 | 0.9981 | 0.9656 | 1.1091 | |
| 7 | 1.0314 | | 0.9290 | | |
| 8 | 0.9869 | | | | |
| 9 | 0.9947 | | | | |
| 10 | 1.0164 | | | | |
| Media | 0.9689 ^a | 1.0290 ^a | 0.9223 ^a | 0.9387 ^a | 0.7555* |
| Desv.Est. | 0.0508 | 0.0393 | 0.0841 | 0.1081 | |

*Este valor no fue empleado en el análisis estadístico

V. DISCUSIÓN

La posibilidad de determinar el sexo de la descendencia antes de la fertilización es uno de los objetivos más importantes dentro del campo de la tecnología de la reproducción, hecho que es posible mediante la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X de los portadores del cromosoma Y ya que en los mamíferos, la determinación del sexo depende del espermatozoide que fecunda al ovocito, de acuerdo al cromosoma que porta (X-hembra, Y-macho) (15). En este trabajo se ensayaron 2 métodos de separación física de los espermatozoides empleando semen de bovino, estos métodos fueron seleccionados en base a reportes previos en los que se empleó semen de humano e indicaron haber obtenido altos grados de enriquecimiento de las poblaciones espermáticas recuperadas (>70%) (48).

Sin embargo, la repetibilidad de estos estudios ha sido cuestionada, razón por la cual en diversos trabajos se ha discutido la importancia de la elección y estandarización de la técnica de validación empleada (18), ya que si esta es inadecuada es posible que la técnica de separación sea valorada incorrectamente incurriendo en falsos positivos o negativos. Debido a que gran parte de la controversia la han generado las técnicas de validación, en este estudio se emplearon 4 técnicas diferentes: tinción con quinacrina, hibridación in situ, PCR en tiempo real y PCR de amplificación complementada con densitometría óptica de geles, sin embargo únicamente la técnica de PCR-tr y la densitometria de geles proporcionó datos que pudieron ser evaluados mediante el análisis estadístico.

En este trabajo se logró desarrollar un PCR-tr sensible y específico empleando los cebadores, diseñados en este mismo trabajo, para el gen SRY y β -actina de bovino, con esto se confirmó el uso potencial de PCR en tiempo real, como técnica de validación del sexaje de espermatozoides, misma que ha sido reportada recientemente para este fin, así como para el sexaje de embriones (26, 29, 76, 77), Si bien los resultados obtenidos mediante esta técnica indican que no se logró la separación de poblaciones de espermatozoides X y Y en ninguna de las técnicas de sexaje ensayadas (gradientes de densidad y filtración en gel), resalta una diferencia numérica entre los valores de la relación de los Ct del control y la fracción FC del gradiente de Ficoll-diatrizoato. Esta diferencia en la cual la relación de los valores Ct de la fracción FC es 8.6 veces menor que los de la fracción control sugieren que esta técnica es eficaz para recuperar una fracción enriquecida con espermatozoides portadores del cromosoma X al fondo del tubo. Sin embargo, para confirmar si esta diferencia numérica podría deberse a una purificación estadísticamente significativa es necesario realizar un mayor número de experimentos de PCR-tr, lo cual también permitiría evaluar la repetibilidad de la técnica de separación.

Por otro lado, si esta separación fuera real, este resultado resulta contradictorio con los reportados por otros autores que trabajaron con semen de humano. Shastry, *et al* (1977) usando el mismo método, pero en un medio con una densidad de 1.08, encontraron que la interfase entre el plasma seminal y la zona media fue la enriquecida con espermatozoides X (74%), mientras que el sedimento contenía el mayor porcentaje de espermatozoides Y (72%) (48). Resultados similares a los de estos autores también fueron corroborados por

Hegde UC, *et al* (1977) quienes obtuvieron un enriquecimiento del 62% de espermatozoides Y en el sedimento, sin embargo Kakeko S, *et al*, empleando una densidad de 1.077 encontraron un enriquecimiento muy pobre (55%) (74).

Aunque los mecanismos de separación por gradientes de densidad son inciertos, nuestros resultados podrían ser atribuidos a que los espermatozoide X que poseen un 3.8% más de ADN que los Y migraron más rápido al fondo del tubo ya que esta diferencia de ADN los hace más pesados y por lo tanto su velocidad de sedimentación es mayor. En cuanto a los resultados obtenidos por los otros autores, es posible que la migración de los espermatozoides Y se viera menos obstaculizada por las partículas del medio de separación menos denso, en cambio los espermatozoides X migraron más lentamente al fondo del tubo al moverse con dificultad a través del medio, permaneciendo en los estratos superficiales. Por otra parte, Kaneko, *et al* mencionan que la separación de los espermatozoides empleando estos métodos podría deberse a diferencias en la velocidad de sedimentación entre los espermatozoides X y los Y, mas que a la formación de los gradientes de densidad (74). No obstante, se sabe que la formación de los estratos en un gradiente de densidad está dada por las diferentes velocidades de sedimentación de los componentes de la muestra (54,55).

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo indican que los métodos de separación por gradientes de densidad, empleando BSA y la separación en columnas de Sephadex, son ineficientes para separar las poblaciones de espermatozoides X y Y de bovino, ya que no se observó una desviación estadísticamente significativa con respecto al control. Estos resultados concuerdan

con los reportados por diversos estudios en los cuales se utilizan técnicas de validación más confiables como la hibridación in situ (14, 17, 75).

No se descarta la posibilidad de que las diferencias entre los resultados obtenidos en este estudio con los de otros investigadores puedan deberse a las modificaciones realizadas a la técnica original como diferencias en la densidad del medio, diferencias en los recipientes empleados para la centrifugación y en consecuencia el volumen y altura de la columna.

Los resultados también pueden atribuirse a diferencias interespecie, ya que la densidad inicial de la muestra influye en el comportamiento de la separación, en este caso los espermatozoides de humano son más pequeños que los espermatozoides de bovino (49).

Por otra parte, la falla en la separación en columnas de Sephadex podrían atribuirse a que el tamaño de las esferas empleadas en este estudio fue mayor al de las empleadas en el trabajo original y que por consiguiente ambas poblaciones hayan fluido simultáneamente a través de la columna. Alegre, *et al* (2008) han sugerido que la separación de las poblaciones X y Y de espermatozoides a través de columnas de Sephadex está dada por la mayor oposición que presentan los espermatozoides Y a ser arrastrados por el fluido de elución, por lo que un factor importante a considerar es la velocidad de elución (16), misma que en este trabajo no fue considerada.

Adicionalmente, en este estudio se logró optimizar el protocolo de extracción del ADN mediante el empleo de papaína y DTT logrando obtener la calidad adecuada para ser empleado en las reacciones de PCR de amplificación. Sin embargo, se requiere incrementar la calidad del mismo de forma que la relación 260/280 sea de

al menos 1.8 para su empleo en PCR-tr. El empleo de proteinasa K en la solución de lisis y fenol - cloroformo para la purificación ha sido descrita previamente en espermatozoides de bovino (76), sin embargo Chandler, *et al* (1998) complementan la solución de lisis con DTT (26). En nuestro ensayo de extracción empleando la proteinasa K no se utilizó DTT, razón por la cuál posiblemente el ADN espermático no se descondensó adecuadamente.

Por otro lado, en este estudio no fue posible detectar diferencias en la amplificación del gen SRY entre las diferentes fracciones obtenidas del proceso de sexaje por densitometría óptica. Si bien la PCR es una técnica cualitativa que permite sintetizar *in vitro* un fragmento de ADN, los resultados de la amplificación no siempre determinan con precisión la cantidad original de copias presentes en la muestra, ya que hacia el final de la reacción de PCR la cantidad de productos obtenidos se mantiene constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción. Es decir, es posible observar que muestras con diferentes concentraciones iniciales del ADN templado tengan el mismo número de copias al final de la reacción. Por ello, la inclusión de una muestra de ADN de espermatozoides X separados mediante citometría de flujo representa un control importante, ya que se conoce el grado de pureza de la población (al menos 90%). Sin embargo, en los ensayos realizados con el ADN purificado de esta población indican que debido a la alta sensibilidad de la técnica, pocas copias del gen SRY pueden ser detectadas por el PCR, lo cual puede provocar que se interpreten falsos negativos en muestras con un enriquecimiento menor al 90%.

Por otro lado, la técnica de hibridación *in situ* para la validación de las técnicas de sexaje posee alta especificidad y más si se cuenta con el diseño adecuado de la

sonda (tamaño y secuencia). En este trabajo no se logró estandarizar la técnica de marcaje de la sonda lo cual impidió por ende valorar la técnica de hibridación *per se*. Los geles indican que no se logró incorporar el nucleótido marcado con el fluorocromo, esto a pesar de que se emplearon 2 enzimas diferentes para la síntesis de la sonda (Taq polimerasa y Klenow). Es posible que las enzimas no hayan reconocido al nucleótido modificado y que por ello no lo hayan incorporado en la cadena sintetizada. Sin embargo, otros autores han reportado el marcaje de sondas para hibridación *in situ* empleando la Taq polimerasa, una diferencia importante podría ser que emplearon nucleótidos marcados con TAMRA o digoxigenina (78, 79).

Así el hecho de que no se haya observado señal fluorescente pudo deberse a diversos factores como son: 1) la inexistencia de la sonda, ya que los resultados de las electroforesis indicaron que no hubo amplificación; 2) intensidad de la señal escasa, el tamaño del producto esperado fue de 307 , siendo una secuencia corta, la cual emite una señal pequeña, sin embargo al tratarse de una secuencia repetida la intensidad de la señal debió haber sido mayor; 3) inadecuada descondensación del núcleo espermático, lo cual pudo haber impedido el ingreso de la sonda y su consecuente hibridación con el ADN genómico.

Finalmente, de las técnicas de validación empleadas para evaluar el grado de separación de las poblaciones X y Y, la tinción con quinacrina es la más antigua y la primera en ser utilizada para diferenciar entre las dos poblaciones de espermatozoides (X y Y), sin embargo, en este estudio no fue posible estandarizar la técnica. Mucho se ha cuestionado en relación a los resultados obtenidos en otros estudios ya que existen reportes que indican que no todos los

espermatozoides Y presentan el denominado cuerpo “Y” o “F”, por lo que el empleo de la misma podría dar falsos positivos en poblaciones en las que predomine la fracción de espermatozoides portadores del cromosoma X. Adicionalmente, los reportes iniciales señalan que la técnica sólo es eficaz en los espermatozoides de humanos y de gorilas, con una frecuencia de observación del $42 \pm 2.5\%$ (80). Bhattacharya *et al*, fueron los primeros en identificar este cuerpo en espermatozoides de toro, y varios años después, se observó un porcentaje aproximado al reportado en el semen de humano (83). Blottner, *et al* reportaron la observación de cuerpo “Y”, sin embargo señalan que la fluorescencia desaparece rápidamente (20 segundos) (83, 84). En este trabajo no se logró observar el cuerpo Y, posiblemente esto también se deba a que se empleó quinacrina dihidroclorada en lugar de mostaza quinacrina como lo reporta Blottner, *et al*. Sin embargo, en trabajos realizados con semen de humanos se ha utilizado indistintamente ambos tipos de quinacrina, modificando únicamente la concentración (quinacrina dihidroclorada al 0.5%, mostaza quinacrina al 0.005% (41, 48, 58, 81, 73).

Aunque en este momento los datos obtenidos son insuficientes, sí sugieren que la fracción FC obtenida del gradiente de Ficoll – Diatrizoato de sodio es rica en espermatozoides portadores del cromosoma X. La reproducibilidad de la técnica debe ser evaluada realizando un mayor número de separaciones bajo las mismas condiciones de manipulación, instrumentos y reactivos.

También es necesario estandarizar las técnicas de validación y de este modo poder evaluar las técnicas de separación realizando modificaciones a las variables

asociadas (concentración del gradiente, velocidad de centrifugación, tiempo de centrifugación, volumen del medio de separación, entre otras).

VI. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos con las técnicas de validación resultan insuficientes para determinar la eficacia de las técnicas de sexaje. Si bien, los resultados obtenidos mediante PCR-tr sugieren que la técnica de separación por gradientes de densidad en columnas de Ficoll-diatrizato de sodio, permite recuperar una fracción al fondo del tubo (fracción FC) con mayor concentración de espermatozoides X, es necesario realizar más repeticiones para determinar si la diferencia numérica es estadísticamente significativa.

VII. ANEXOS

1. CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE TORO

REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS.

Reactivos.

Medio RPMI 1640 GIBCO Cat. No. 11875-101
 L-glutamina Sigma No. G-13126
 Penicilina 800 000 U
 Estreptomina
 PHA (fitohemaglutinina) GIBCO Cat. No. 10576-015
 Colchicina Sigma C-9754
 Cloruro de potasio (KCl) Sigma P-9541
 Metanol absoluto Grado analítico
 Ácido acético glacial Grado analítico
 Giemsa Merck C-94035518
 Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) Grado analítico
 Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) Grado analítico
 Etanol Absoluto Grado analítico
 Aceite de inmersión
 Agua bidestilada estéril

L-glutamina 1%

1 g de L-glutamina en 100 ml de agua destilada estéril. Hacer alicuotas de 1 ml y mantener en congelación

Penicilina – Estreptomina

A 1 g de estreptomina agregar 5 ml de agua estéril.
 A 800 000 U de penicilina agregar 5 ml de agua estéril
 Tomar 0.5 ml de cada una y llevar a 10 ml con agua estéril. Hacer alicuotas de 1 ml y mantener en congelación.

PHA

Reconstituir de acuerdo a la instrucciones del fabricante. Alicuotar en microtubos 1.5 ml estériles y mantener en congelación.

RPMI suplementado o completo

100 ml RPMI 1640
 1 ml L-glutamina
 1 ml penicilina - estreptomina

Mantener en refrigeración a 4°C

Colchicina 0.02%

0.02 g colchicina en 100 ml de agua destilada

Mantener en refrigeración a 4°C

Sol. Hipotónica KCl 0.075 M

2.8g KCl en 500 ml de agua destilada

Mantener en refrigeración o temperatura ambiente.

Sol. Fijadora de Carnoy

Metanol absoluto-Ácido acético glacial 3:1

75 ml metanol + 25 ml de ácido acético

Preparar al momento de usar.

Giemsa

5 ml de colorante Giemsa + 45 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8

Amortiguador de fosfatos pH 6.8

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 6.63 g

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 2.56 g

Aforar a 1 litro de agua destilada y ajustar pH 6.8

O bien

Solución A

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 9.47g/l

Solución B

Fosfato de potasio monobásico (Na_2HPO_4) 9.08g/l

Buffer de fosfatos pH 6.8

50 ml de la solución A

50 ml de la solución B

Buffer de fosfatos pH 7

72 ml de la solución A

38 ml de la solución B

Materiales

Tubos de centrifuga cónicos de 15 ml (polipropileno), estériles

Pipeta serológica de 5, 10 ml

Micropipeta de 10 a 40 μ l o de 10 a 200 μ l
Puntas universales para micropipeta (amarillas de 200 μ l)
Pipetas Pasteur con bulbo
Vaso de precipitado 50, 150 o 200 ml
Portaobjetos de 25x75 mm
Cubreobjetos de 24x50 mm
Vasos de coplen
Gradillas
Agua bidestilada estéril
Gasas
Lápiz con punta diamante

Instrumentos

Campana de flujo laminar
Incubadora 37°C
Centrífuga para tubos cónicos de 15 ml (3500 rpm)
Microscopio óptico
Baño maría 60°C
Vórtex

PROCEDIMIENTO

Muestra

2 ml de sangre periférica y/o 2 ml de médula ósea heparinizadas [cuando la muestra tiene >24hrs de haber sido tomada]

Siembra

En campana de flujo laminar sembrar por duplicado cada una de las muestras.
Adicionar a un tubo de polipropileno de 15 ml estéril 5 ml de medio RPMI 1640, 100 μ l de PHA y 11 gotas de sangre periférica y/o médula ósea.
Agitar suavemente para homogenizar e incubar a 37°C 7 2 hrs.

Cosecha

Una hora y media antes de que se cumplan las 72 hrs adicionar 35 μ l de colchicina.
Reincubar 30 minutos.

Centrifugar a 2500 rpm por 7 minutos.

Decantar, dejando 0.5 ml del sobrenadante

Resuspender y agregar gota a gota 2 ml de sol. hipotónica KCl 0.075 M a 37 °C. Agregar sol hipotónica hasta 10 ml.

Incubar 30 minutos a 37°C

Prefijar: Antes de centrifugar, agregar 1 ml de sol. de Carnoy fresca y fría y agitar en el vórtex (cambia de color, de rojo a café por oxidación de la hemoglobina).

Centrifugar a 2500 rpm por 7 minutos

Decantar, dejando 0.3 a 0.5 ml del sobrenadante

Resuspender y agregar gota a gota la sol. Carnoy (fijador) fría y fresca hasta un total de 10 ml.

Dejar reposar a temperatura ambiente por 20 minutos.

Centrifugar a 2500 rpm por 7 minutos

Decantar, dejando 0.5 ml del sobrenadante

Resuspender y agregar fijador hasta un total de 10 ml en agitación

Centrifugar a 2500 rpm por 7 minutos

Decantar, dejando 0.5 ml del sobrenadante

Repetir los lavados con fijador hasta observar un botón blanco (2 – 3 lavados)

Decantar, resuspender y adicionar fijador hasta aproximadamente 0.7 ml (el volumen dependerá del tamaño del botón)

Preparar laminillas

Los portaobjetos deben estar previamente desengrasados y conservados en alcohol de 96°.

Secar las laminillas con gasa y marcar con lápiz diamante con la clave del paciente.

Humedecer la laminilla con fijador y retirar el exceso. Colocar la laminilla en una posición inclinada $\pm 45^\circ$ gotear con una micropipeta 30 μ l y en seguida otros 30 μ l de la muestra.

Si la muestra presenta metafases con cromosomas sobrelapados o muy cerradas, secar la laminilla colocándola en el vapor de un baño maría a 75°C por 3-6 minutos.

Teñir la laminilla y observar al microscopio.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cuevas I, Llácer J, Ten J, Mendiola J, Bernabeu R. Situación actual de la selección de sexo. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 2002; 19(5): 337-343.
- (2) Zarutskie PW, Muller CH, Magone M, Soules MR. The clinical relevance of sex selection techniques. *Fertil Steril*. 1989; 52(6):891-905
- (3) Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art. *Animal Reprod Sci*. 2001; 60-61: 93-107.
- (4) Luderer AA, Dean WW, Zine AR, Hess DM, Foote RH, Wal RJ. Separation of bovine spermatozoa by density on water insoluble Newtonian gels and their use for insemination. *Biol Reprod*. 1982; 26(5):813-824
- (5) Pallas R, D Alba C. Impacto de nuevas tecnologías de inseminación artificial en la gestión de un centro de inseminación artificial. *Venezuela Porcina*. [Serial on Line] 2006 Mar [cited] 2008 Jul. 1(1):[1 screen]. Available from: URL: <http://www.pcca.com.ve/vp/articulos/vp46p25.html>
- (6) SAGARPA. Situación actual y perspectivas de la producción de **leche** de bovino en México 2005 [Serial on Line] [cited] 2008 Feb 1(1):[1 screen]. Available from: URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/estudio/sitlech05.pdf>
- (7) Mariscal AV, Estrella QH, Ruiz FA, Sagarna VM, Salas GJM, González AM. La cadena productiva de bovinos lecheros y el TLCAN. Confederación Nacional de Organizaciones Ganaderas [Serial on Line] 2002 Mar [cited] 2008 Jul1 (1): [1screen]. Available from: URL: www.cnog.com.mx/Estudios/Estudios/La%20cadena%20productiva%20de%20Bovinos%20Lecheros%20y%20el%20TLCAN.pdf

- (8) Valencia JM. Situación actual y perspectivas del sexado de semen. Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatría. 2001. Veracruz, México. 87-91.
- (9) Zamudio-Nieto A, Herrera Haro JG, García Winder M, Gallegos-Sánchez J, Sánchez-Aldana A, Valencia-Méndez J. Factores que afectan la proporción de sexos en becerros provenientes de la transferencia de embriones. *Agrociencia*. 2004 .38 (4): 405-412.
- (10) Aysa DSJ, Medrano HJA, Villa GA, Romo GS Producción de embriones de bovinos de sexo predeterminado utilizando semen sexado y fertilización in vitro: resultados preliminares. Memorias del XXIX Congreso Nacional de Buiatría. 2005.
- (11) Seidel GE Jr. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology*. 2003; 59 (2): 585-598.
- (12) Guerrero CAM, Efecto del paso de semen de conejo en columnas de Sephadex sobre la proporción de espermatozoides X e Y. (tesis de licenciatura). D.F. (México): UNAM, 1981.
- (13) Cruz GMI1, González MH2, Fierro PR2, Cortés BE2, Ortiz MR2, Romo GS. Análisis del contenido de DNA en espermatozoides de bovino por citometría de flujo, como base del sexado espermático. Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatría. [Serial on Line] 2001 Aug [cited] 2008 Ene [42 screen]. Available from: URL:
<http://www.ammveb.net/XXV%20CNB/buiatria/conferencias/reproduccion/reproduccioncart5.htm>
- (14) Flaherty SP, Michalowska J, Swann JJ, Dmowski WP, Mathews CD, Artken RJ. Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997; 12(5): 398-942.

- (15) Parrilla I, Vázquez JM, Martínez EA. Estado actual de la selección de sexo en el ganado porcino. *Avances en Tecnologías Porcinas*. 2005; 2(10): 57-71.
- (16) Alegre B, Domínguez JC, Cisale H, González R, Tejerina F, García JC, Peláez H, Bernal S, Cárdenas S, Córdova CA, Abad M, Abad F. Mejora y sexado de semen porcino. *Memorias del 5to. Seminario Internacional en Reproducción Animal y Producción de leche y carne*. 2008. D.F. México. 147-158.
- (17) Rose GA, Wang A. Experiences in Hong Kong with the theory and practice of the albumin column method of sperm separation for sex selection. *Hum Reprod*. 1998; 13(1): 146-149
- (18) Jafar SI, Flint APF. Sex selection in mammals: a review. *Theriogenology*. 1996; 46(1): 191-200.
- (19) Delgado EI. Nettie Maria stevens y la función de los cromosomas sexuales. [Serial on Line] 2001 Aug [cited] 2008 Ene [42 screen]. Aviable from: URL: wzar.unizar.es/siem/articulos/Premios/descubrimientocromosomas.pdf
- (20) Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Argetsinger JS Molecular biology of the gene. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. 1987. USA. 4ta. 776p.
- (21) Tamarin RH, Principles of genetics. McGrawHill. 1999. USA. 686p.
- (22) Nicholas, F.W. Genética veterinaria. Acribia. 1990. España.
- (23) Cheng H, Shi H, Zhou R, Guo Y, Liu L, Liu J, Jiang Y, Kudo T, Sutou S. Characterization of bovidae sex-determining gene SRY. *Genet Sel Evol*. 2001; 33(6): 687-694.
- (24) Lu W, Rawlings N, Zhao J, Wang H. Amplification and application of the HMG box of bovine SRY gene for sex determination. *Anim Reprod Sci*. 2007; 100 (1-2): 186-191.
- (25) Rosenfeld CS, Roberts RM. Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. *Biol. Reprod*. 2004; 71(4): 1063-1075.

- (26) Chandler JE, Steinholt-Chenevert C, Adkinson RW, Moser EB. Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by polimerase chain reaction, Calving and Forrowing Records. *J. Dairy Sci.* 1998; 81(7): 1855-1867.
- (27) Rorie RW. Effect of timing of AI on sex ratio. *Theriogenology.* 1999; 52(6):1273-1280.
- (28) Beernik FJ, Dmowsky WP, Ericsson RJ. Sex preselection through albumin separation to sperm. *Fertil Steril.* 1993; 59 (2): 382-386.
- (29) Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A. Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology.* 2006;66 (9): 2202-2209.
- (30) Hassan AD. Separation techniques for X and Y chromosome bearing human spermatozoa. [Serial on Line] 2005 Ene [cited] 2008 Jul [106 screen].
 Aviable from: URL:
http://libserv5.tut.ac.za:7780/pls/eres/wpg_docload.download_file?p_filename=F2126105470/abu.pdf
- (31) Hohenboken WD. Aplications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology.* 1999; 52(8): 1421-1433.
- (32) Wang HX, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD. Assessment of the separation of X- and Y-bearing sperm on albumin gradients using double-label fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril.* 1994; 61 (4): 720-726.
- (33) Jaffe SB, Jawelewicz R, Wahl E, Khatamee MA. A controlled study for gender selection. *Fertil Steril.* 1991; 56(2):254.258.
- (34) Seidel GE Jr. Sexing mammalian sperm - intertwining of commerce technology, and biology. *Anim Reprod Sci.* 2003; 59(3-4): 145-156.
- (35) Garner DL: Sex- sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J Androl.* 2001; 22(4):519-526.

- (36) Chandler JE, Wilson MP Canal A, Steinholt-ehenevert HC. Bovine Spermatozoa head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. *Theriogenology*. 1999 52 (6): 1021-1034.
- (37) Peter AT, Jones PP, Robinson JP. Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: A rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the H-Y antigen. *Theriogenology*. 1993; 40 (6): 1177-1185.
- (38) Howes ES, Miller NGA, Dolby C, Hutchings A, Butcher GW, Jones R. A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. *J Reprod Fertil*. 1997; 110 (2): 195-204.
- (39) Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA, Johnson LA. Quantification of the X- and Y- chromosome- bearing sperm of the domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod*. 1983. 28(2): 312-321.
- (40) Zarutskie PW, Muller CH, Magone M, Soules MR. The clinical relevance of sex selection techniques. *Fertil Steril*. 1989; 52 (6): 891-905.
- (41) Beckett TA, Martin RH, Hoar DI. Assessment of the Sephadex technique for selection of X- bearing human sperm by analysis of sperm chromosomes, deoxyribonucleic acid and Y- bodies. *Fertil Steril*. 1989;52(5): 829-835.
- (42) Brakke MK. The Origins of Density Gradient Centrifugation Fractions. *Fractions*. 1979; 1: 242-250
- (43) Alberts B. *Molecular biology of the cell*. Barcelona. Médica panamericana. 2006.
- (44) Dmowsky WP, Gaynor L, Rao R, Lawrence M, Scommegna A. Use of albumin gradients for X and Y separation and clinical experience with male sex preselection. *Fertil Steril*. 1979; 31(1): 52-57.

- (45) Beal WE, White LM, Garner DL. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient. *J Animal Sci.* 1984; 58(6): 1432-1436.
- (46) Lin SP, Lee, RK, Tsai Y, Hwu YM, Lin M. Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent *In situ* hybridization. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15 (4): 565-569.
- (47) Pickering SJ, Fleming TP, Braude PR, Bolton VN, Gresham GAG. Are human spermatozoa separated on a Percoll density gradient safe for therapeutic use? *Fertil Steril.* 1989; 51 (6): 1024-1029.
- (48) Shastry PR, Hegle UC, Rao SS. Use of ficoll- sodium metrizoate density gradient to separate X- and Y- bearing spermatozoa. *Nature.* 1977; 269 (5623):58-60.
- (49) Garner DL: Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology.* 2006; 65 (5): 943-957.
- (50) Van Muster EB, Stap J, Hoebe RA, Te Meerman GJ, Aten JA. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y- bearing spermatozoa: potentials and limitations. *Theriogenology.* 1999; 52 (8): 1281-1293.
- (51) Van Muster EB, Stap J, Hoebe RA, Te Meerman GJ, Aten JA. Difference in volume of X- and Y-chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content. *Cytometry.* 1999; 35(2): 125-128.
- (52) Kobayashi J, Oguro H, Uchida H, Kohsaka T Sasada H, Sato E. Assessment of bovine X- and Y- bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence *in situ* hybridization. *J. Reprod Dev.* 2004 50 (4): 463-469.

- (53) Anónimo. Centrifugación. [Serial on Line] 2005 Feb [cited] 2008 Jul 4(4):[4 screen]. Available from: URL: <http://es.geocities.com/centrifugacion/>
- (54) Chang, W. Físicoquímica con aplicación a sistemas biológicos. CECSA. México. 1984.
- (55) Freifelder D.M. Técnicas de bioquímica y biología molecular. Reverte. Barcelona 1981, 297-380 p.
- (56) Sheldon BC, West SA. Maternal Dominance, Maternal Condition, and Offspring Sex Ratio in Ungulate Mammals. *Am Nat.* 2004; 63(1): 40-54
- (57) Gel filtration. Principles and methods. [Serial on Line] 2001 Aug[cited] 2008 Jul [124 screen]. Available from: URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_gelfiltration.pdf
- (58) Quinlivan WLG, Preciado K, Long TL, Sullivan H. Separation of albumin gradients and Sephadex chromatography. *Fertil Steril.* 1982; 37(1): 104-107.
- (59) Classens OE, Franken DR, Oosthuizen CJJ, Kruger TF. Fluorescent in situ hybridization evaluation of human Y-bearing spermatozoa separated by albumin density gradients. *Fertil Steril.* 1995; 63(2): 417-418.
- (60) Hare WCD, Singh EL. Citogenética de la reproducción animal. Acribia. 1979 España. 65p.
- (61) Halnan CRE. Cytogenetics of animals. CAB International. 1989. UK.
- (62) Leber KL, Wilmoth LB. World of genetics Gale Group. 2002. Canada. 556p
- (63) Trask B. Fluorescence in situ hybridization. A review of the role of FISH in genome analysis, supporting background information, and detailed protocols. *Genome Analysis: a Laboratory Manual.* 1995.
- (64) Pomoi AA, Argemi J. Tratado de endocrinología pediátrica. Educiibes Duas de Santos. 1997. España. 2da. Ed.

- (65) Griffinths AJF, Meller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbarte WM. An introduction to genetic analysis. Freeman. 1996. USA. 6ta. 444p.
- (66) Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem.* 2002. 302(1):52-9.
- (67) Anónimo. PCR en tiempo real. Introducción. Cultek [Serial on Line] 2003 may [cited] 2008 jun1(1):[1 screen]. Aviable from: URL:
<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Q-PCR-Introduccion.pdf>
- (68) Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real [Serial on Line] [cited] 2008 Feb 1(1):[1 screen]. Aviable from: URL:
external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/temas/m2t12.pdf
- (69) Caballero RJC, Moyano E, Muñoz BJ Purificación de ADN plasmídico y electroforesis del mismo en gel de agarosa. [Serial on Line] 2003 may [cited] 2008 jun1(1):[1 screen]. Aviable from: URL:
www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/38%20PURIFICACIÓN%20DNA%20PLÁSMIDO.pdf
- (70) Garner DL, Seidel GE Jr. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology.* 2008; 69(7):886-95.
- (71) Palma GA, Olivier NS, Neumüller Ch, Sinowatz F. Effects of Sex-sorted Spermatozoa on the Efficiency of in vitro Fertilization and Ultrastructure of in vitro Produced Bovine Blastocysts. *Anat Histol Embryol.* 2008; 37(1):67-73.
- (72) Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, Dinnyes A, Ji W, Tian XC, Yang X, Du F. Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle Embryos Fertilized n Vitro with Sex-Sorted Sperm. *J Dairy Sci.* 2006; 89(7):2510-8.

- (73) Blottner S, Pitral C, Berger U. Y-chromosome-specific fluorescence (f-body) of poorly decondensed bovine spermatozoa. *Andrologia*. 1992; 24(5): 255-259.
- (74) Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Iizuka R. Separation of human X- and Y-bearing sperm using percoll density gradient centrifugation. *Fertil Steril*. 1983 40 (5): 661-665.
- (75) Chen MJ, Guu HF, Ho ES. Efficiency of sex pre-selection of spermatozoa by albumin separation evaluated by double labelled fluorescence in situ hybridization. *Hum Reprod*. 1997; 12 (9): 1920-1926
- (76) Chandler JE, Canal AM, Paul JB, Moser EB. Collection Frequency affects percent Y chromosome bearing sperm, sperm head area and quality of bovine ejaculates. *Theriogenology*. 2002; 57 (5): 1327-1346.
- (77) Puglisi R, Vanni R, Galli A, Balduzzi DM, Parati K, Bongioni G, Crotti G, Duchi R, Galli C, Lazzari G, Aleandri R. *In vitro* fertilisation with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction*. 2006; 132: 519-526.
- (78) Haberman FA, Winter A, Olsaker I, Reichert P, Fries, R. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence in situ hybridization. *J. Anim. Breed. Genet*. 2005; 122 (suppl 1): 22-27.
- (79) Kobayashi J, Sekimoto A, Uchida H, Wada T, Sasaki K, Sasada H, Umezumi M, Sato E. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev*. 1998; 51 (4): 390-394.
- (80) Pearson PL, Babrow M, Vosa CG, Barlow PW. Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes. *Nature*. 1971; 231(5301): 326-329.
- (81) Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature*. 1973; 246(5432): 421-424.