



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD E INTEGRIDAD DEL
SEMEN BOVINO SEXADO MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN POR
DENSIDAD DE GRADIENTES CON FICOLL-DIATRIZOATO DE
SODIO ANTES Y DESPUÉS DE LA CRIOPRESERVACIÓN**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA

MA. TRINIDAD ARACELI CHÁVEZ GARCÍA

TUTOR:

MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

COMITÉ TUTORAL:

**CARLOS S. GALINA HIDALGO
JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ**



México, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional autónoma de México, por permitirme ser parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser mí segundo hogar.

Al CONACYT por el apoyo recibido para la realización de mis estudios.

A la Doctora María de Lourdes Juárez Mosqueda por la paciencia, confianza y el tiempo dedicado al desarrollo de mi trabajo.

Al Doctor Carlos S. Galina Hidalgo por su apoyo, confianza y cariño.

Al Doctor José Alfredo Medrano por el apoyo y solidaridad para la realización de mi trabajo.

A todos los miembros de CEIPSA, por el apoyo para la realización de mi investigación.

Al Doctor Octavio Mejía Villanueva por el apoyo incondicional en el desarrollo del mi trabajo.

Al Doctor Javier de Jesús Valencia Méndez por sus comentarios acertados.

Al Doctor Héctor Jiménez Severiano por sus observaciones.

Al Doctor Salvador Romo García por su amabilidad y comentarios.

Al Doctor Oscar Gutiérrez Pérez por apoyo y amistad incondicionales de invaluable valor.

A todos los miembros del área de Morfología en especial a Male por su constante apoyo durante todos los días.

A todos los integrantes de área de Reproducción por su amistad y apoyo.

A Jerónimo Soto por ser mi amigo en todos los momentos.

A mis hermanas por su cariño y apoyo ilimitados.

A Denis y Fabio por compartirme su maravillosa niñez.

A Chio quien siempre está con un su hombro noble, sereno y comfortable.

DEDICATORIA

Gracias infinitas a la vida y Dios como el gran creador

A mis hijos depositarios de mi amor, por los que le doy gracias a la vida todos los días

A Regina, porque es una fuente de sueños, amor, ternura, luz y paz en mi vida

A mi mamá quien me enseñó a amar, a confiar y a trabajar por lo que se quiere y sueña

ÍNDICE

ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VI
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	VI
RESÚMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
I INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES.....	2
2.1 Determinación del sexo.....	2
2.2 Selección del sexo.....	4
2.3 Importancia y aplicaciones de la selección del sexo en la producción bovina.....	5
2.4 Sexado de espermatozoides por citomertría de flujo.....	7
2.5 Separación de espermatozoides por centrifugación en gradientes de densidad.....	9
2.5.1 Fundamento teórico de la técnica de separación.....	9
2.5.2 Tipos de centrifugación.....	11
2.5.3 Separación de espermatozoides por centrifugación en gradientes de densidad.....	15
2.6 Criopreservación espermática.....	17
2.7 Evaluación de la integridad funcional de los espermatozoides.....	20
III Justificación.....	23
IV Hipótesis.....	24
V Objetivos.....	24
VI Objetivos específicos.....	24
VII Material y métodos.....	25
VIII Resultados.....	37
IX Discusión.....	41
X Conclusiones.....	45
XI Bibliografía.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diferencias existentes entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y Y que han sido utilizadas por algunos autores como base para la separación espermática.....	4
Cuadro 2. Proporción de crías machos nacidos de 1988 a 1993 provenientes de transferencia de embriones, según la estación del año.....	6
Cuadro 3. Porcentajes de gestación, en novillas empleando semen sexado y semen congelado como control.....	8
Cuadro 4. Resultados obtenidos por diferentes investigadores, utilizando centrifugación en gradientes de densidad para separar las poblaciones espermáticas.....	17
Cuadro 5. Porcentaje de motilidad progresiva obtenido en los diferentes medios de transporte evaluados (3 repeticiones de cada uno).....	27
Cuadro 6. Composición del medio mínimo de cultivo (MCM).....	28
Cuadro 7. Promedio del porcentaje de motilidad obtenida utilizando Baño María durante el manejo de la muestra (10 repeticiones).....	28
Cuadro 8. Promedio del porcentaje de motilidad obtenida sin utilizar Baño María durante el proceso de la muestra (3 repeticiones).....	29
Cuadro 9. Promedio de motilidad progresiva obtenido con 2 (3 repeticiones) y 4 (10 repeticiones) lavados de la muestra.....	29
Cuadro 10. Promedio de motilidad progresiva al descongelar, utilizando 2 medios diferentes de congelación (3 muestras de cada uno).....	30
Cuadro 11. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides vivos en el semen no sexado, en el sexado, en el descongelado no sexados y en el descongelado sexado.....	37
Cuadro 12. Promedio de motilidad progresiva y por toro de los espermatozoides por toro y en promedio, no sexados, sexados, descongelados no sexados y descongelados sexados.....	38
Cuadro 13. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides no sexados, vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma.....	38
Cuadro 14. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides sexados, vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma.....	39
Cuadro 15. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides descongelados no sexados, vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma.....	39

Cuadros 16. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides sexados descongelados vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos con acrosoma.....	40
Cuadro 17. Porcentaje promedio de la motilidad progresiva, de espermatozoides vivos, vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma en las muestras de espermatozoides no sexados, sexados, descongelados no sexados y descongelados sexados.....	40

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Diferencias entre el contenido de DNA del cromosoma X y Y en diferentes especies de mamíferos.....	5
---	---

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuerzas que rigen el movimiento de una partícula dentro de un fluido.	10
Figura 2. Variación en la osmolaridad, de la sacarosa, Ficoll y Percoll, ajustando la osmolaridad del Percoll a 300 mOsm.....	15
Figura 3. Imágenes de los espermatozoides evaluados con tinción de eosina-nigrosina.....	32
Figura 4. Imágenes de espermatozoides evaluados con la Prueba dual de resistencia hiposmótica / azul brillante de Coomassie (HOST/BBC).....	34
Figura 5. Imágenes de los espermatozoides evaluados con tinción de azul de Coomassie.....	33
Figura 6. Evaluaciones de las muestras, antes del sexado, después del sexado y después del descongelado de las muestras sexadas y no sexadas.....	41

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proceso de sexado de semen por centrifugación en gradiente de densidad....	34
---	----

RESUMEN

La separación por sexo de los espermatozoides mamíferos tiene varias aplicaciones: mejora genética, control de las enfermedades ligadas al sexo, preservación de animales en peligro de extinción o para la obtención del sexo deseado en animales de producción. Trabajos anteriores en varias especies de mamíferos, incluyendo el ganado bovino, reportan el sexado de los espermatozoides utilizando gradientes de densidad, sin embargo en dichos estudios no se reporta la viabilidad de los espermatozoides después del proceso de criopreservación. El objetivo del presente trabajo fue determinar la viabilidad e integridad del semen bovino después de ser separado mediante centrifugación con Ficoll-Diatrizoato de sodio y someterlos en seguida al proceso de criopreservación. Después de realizar el proceso de separación, el 72% de los espermatozoides mostraron motilidad progresiva y el 45% estuvieron vivos con acrosoma intacto, mientras que los valores para estos parámetros en las células descongeladas fueron de 59.4 y 38% respectivamente, habiendo una diferencia significativa ($p < 0.05$). Estos últimos resultados están dentro de los porcentajes aceptados para inseminación, sin embargo queda por comprobar el enriquecimiento de espermatozoides portadores del cromosoma X, pero de ser positivo el resultado sería una técnica de sexado que permite mantener una viabilidad e integridad adecuadas de las células además de ser práctica de realizarse.

Palabras claves: separación, centrifugación, gradiente de densidad, viabilidad espermática.

ABSTRACT

The separation by sex of mammalian sperm has several applications: breeding, control of sex-linked diseases, preservation of endangered animals or for obtaining the desired sex in farm animals. Previous works in several mammalian species, including cattle, reported sexing sperm using density gradients, but in these studies did not report the viability of spermatozoa after cryopreservation. The aim of this study was to determine the viability and integrity of bovine semen after being separated by centrifugation with Ficoll-sodium diatrizoate and then subjected to the process of cryopreservation. After performing the separation process, 72% of the spermatozoa showed progressive motility and 45% were alive with intact acrosome, while the values for these parameters in the thawed cells were 59.4 and 38% respectively, having a significant difference ($p < 0.05$) These last results are within the accepted rates for insemination, but it remains to verify the enrichment of sperm carrying the X chromosome, but if this last were positive this sexing technique will allow to maintain a good viability of the cells in addition to being easy to carried out.

Key words: separation, centrifugation, density gradient, sperm viability.

I Introducción

En los mamíferos, cuando un óvulo, el cual contiene un cromosoma X, es fecundado por un espermatozoide portador ya sea de un cromosoma X o un cromosoma Y, origina en el primer caso un cigoto XX, que dará origen a una hembra (sexo homogamético), y en el segundo dará como resultado un macho con la fórmula cromosómica XY. Es decir, es el espermatozoide el que determinará el sexo de la cría, y dado que la mitad de los espermatozoides producidos por un macho portan el cromosoma "X" y la otra mitad el "Y", las cifras de nacimientos de machos y de hembras se distribuirá, aproximadamente, en un 50% de cada sexo (Lush, 1925, López, 2005, Galina y Valencia, 2008).

Sin embargo, el poder seleccionar el sexo de las crías en los mamíferos antes del nacimiento tiene varias aplicaciones, por ejemplo, para el mejoramiento genético en los animales domésticos, en el ser humano para el control de las enfermedades ligadas al sexo, en fauna silvestre para la preservación de animales en peligro de extinción o en la producción de especies cinegéticas donde los machos son mucho más valorados para la caza que las hembras. De los animales domésticos, el ganado vacuno es una de las especies en las que comercialmente la selección del sexo daría muchas ventajas (Maxwell *et al*, 2004, Garner, 2003). Concretamente, en la ganadería productora de leche, el sexado del semen para producir becerras es uno de los objetivos que se pretenden alcanzar, para su empleo por inseminación artificial, debido a la demanda que existe por conseguir reemplazos con alta calidad genética (Zamudio *et al*, 2004, Seidel, 2006).

Hasta ahora, tanto en la monta natural como en la inseminación artificial (IA), la proporción de sexos en las crías es 50% machos y 50% hembras; No así en las crías provenientes de la transferencia de embriones donde se ha encontrado que la proporción de machos es mayor, que la de hembras (Zamudio *et al*, 2004, Seidel, 2007).

Por otra parte, se ha determinado que en los bovinos, el espermatozoide "X" contiene 3.8% más ADN que el espermatozoide "Y", aunque la diferencia puede ser hasta del 4.2%, dependiendo de la raza. Esta diferencia en el contenido de ADN entre los cromosomas X y Y ha sido utilizada para separar las poblaciones espermáticas, encontrándose que entre mayor sea la diferencia del contenido de ADN más eficiente podrá ser la separación de las poblaciones (Seidel, 2006, Garner, 2006, Maxwell, *et al*, 2004).

De manera importante la obtención de descendencia del sexo deseado tras la inseminación artificial con los espermatozoides sexados, dependerán de la condición fisiológica y estructural de las células. Así la evaluación de la integridad y el grado de funcionalidad de los diferentes parámetros espermáticos, son considerados pre-requisitos prioritarios para estimar la capacidad fecundante de los espermatozoides, por lo mismo es fundamental estudiar las alteraciones de la arquitectura espermática que puedan afectar la viabilidad y capacidad de fertilización del semen (Gadea, 2001, Gadella, 2008, Rodríguez Martínez, 2000).

En el análisis rutinario del semen, se incluye un examen macroscópico y microscópico del eyaculado en los que se mide el volumen, concentración, motilidad, estado del acrosoma y las morfoanomalías espermáticas, donde el estudio de la membrana ha sido seleccionado como uno de los mejores parámetros para evaluar la funcionalidad del espermatozoide, ya que ésta interviene activamente en la mayoría de las fases del proceso de fertilización. (Schenk y Seidel, 1999, Gadea, 2001).

II Antecedentes

2.1 Determinación del sexo

En 1910, Guyer divulgó la presencia de los cromosomas sexuales. Desde entonces, biólogos y médicos de cuando en cuando han tratado de encontrar la técnica para preseleccionar el sexo de la progenie. Una de las primeras tentativas significativas de preselección del sexo fue conducida en 1925 por Lush, cuya finalidad fue diferenciar a los espermatozoides, en función del cromosoma sexual que presentaran. Sin embargo este objetivo sólo fue vislumbrada hasta que Moruzzi en 1979, puso atención en utilizar al DNA para la preselección del sexo, publicando datos que demostraron diferencias entre el espermatozoide portador del cromosoma X y el portador de Y, en una numerosa variedad especies, esto después de realizar 524 cariotipos de diferentes especies. Esta diferencia fue atribuida al mayor tamaño que presenta el cromosoma X en relación al Y, y hasta hoy es la única diferencia cuantificable y válida desde un punto de vista científico que ha sido tomada como base para la separación de las poblaciones espermáticas (Johnson y Welch, 1999). Si bien es cierto que a lo largo de la historia ha habido un gran optimismo para lograr este objetivo, también se han producido muchas decepciones para lograrlo. Por ejemplo, muchas de las fallas iniciales pueden ser atribuidas a falta de conocimiento de los principios que rigen la determinación del sexo en los mamíferos. Así, esta ambigüedad nos regresa por lo menos a los griegos, cuando Demócrito, 470 – 402 A.C., se aventuró a sugerir que el testículo

derecho producía varones, mientras que el testículo izquierdo producía hembras. Por fortuna, los cromosomas sexuales fueron observados en mamíferos y desde entonces los científicos han intentado fraccionar a los espermatozoides en las células portadoras del cromosoma X o Y, siendo sin embargo ineficaces muchas de las técnicas empleadas para tal fin (Guyer, 1910, Lush, 1925, Johnson y Welch, 1999, Moruzzi, 1979).

La respuesta a la pregunta de porqué hay tanta tradición sobre la manipulación de los porcentajes del sexo, la respuesta sería que es debido a la carencia del entendimiento de las leyes de la probabilidad. Es decir no es del todo inusual obtener 10 nacimientos masculinos consecutivos, la probabilidad es $1:1024$, entonces si hay 1 millón de cabezas de ganado en América de Norte, por probabilidad pueden nacer 10 machos o 10 hembras consecutivas cada año, sin embargo, los granjeros cuando recuerdan haber conseguido 10 toros consecutivos de 12, se lo atribuyen a veces al cambio de alimento o un cierto acontecimiento coincidente que ocurrió en ese tiempo en particular, aunque el cociente de sexo sesgado es casi siempre debido a la probabilidad (Johnson y Welch, 1999, Parrilla, 2005, Garner y Seidel, 2008).

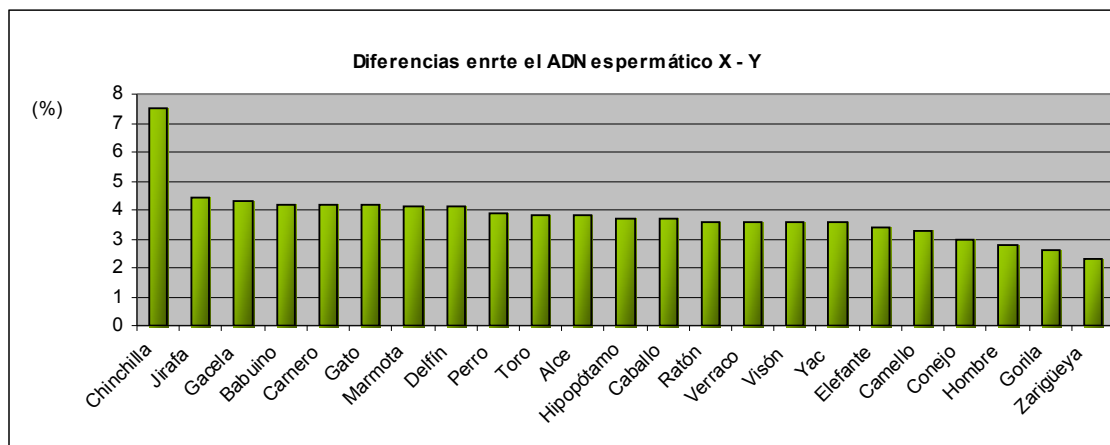
2.2 Selección del sexo

En los últimos 70 años han sido propuestos numerosos métodos para la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y (Cuadro 1) basados tanto en aspectos físicos (diferencia en el contenido de ADN, tamaño, motilidad, densidad e incluso la carga superficial), así como en aspectos inmunológicos (presencia del antígeno H-Y en la membrana plasmática del espermatozoide Y) (Cuadro 1). Sin embargo, se menciona que estas características pueden variar entre una misma especie y que aunque algunas de estas diferencias sean reales, son tan pequeñas que es casi imposible medirlas (Winsor, *et al*, 1993, Van Munster, *et al* 1999, Parrilla, 2005).

Cuadro 1. Diferencias existentes entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y Y que han sido utilizadas por algunos autores como base para la separación espermática.

Parámetro	Diferencia entre X y Y	Referencia
Cuerpo F	En espermatozoide Y	Winsor, <i>et al</i> , 1993.
Densidad	Diferente entre los espermatozoides portadores de X y Y.	Winsor, <i>et al</i> , 1993.
Tamaño	Mayor tamaño del espermatozoide X	Van Munster <i>et al</i> , 1999.
Carga superficial	Espermatozoides portadores de X, migran al cátodo	Parrilla, 2000.
ADN	Mayor contenido de ADN en el espermatozoide X	Moruzzi, 1979, Garner, 2006.

Actualmente, a pesar de que morfológicamente los espermatozoides son esencialmente idénticos, las técnicas de separación se basan en la diferencia del contenido de ADN o la densidad entre los X y Y. En cuanto al contenido de ADN, la menor diferencia la presenta la zarigüeya (2.3%) y la mayor la chinchilla (7.5%), conociéndose hasta el momento la de 23 especies de mamíferos (Garner y Seidel, 2008, Resende, 2007, Garner, 2006, Moruzzi, 1979, Garner y Seidel, 2003) (Grafica 1).



Garner, 2006

Grafica 1. Diferencias entre el contenido de DNA del cromosoma X y Y en diferentes especies de mamíferos.

2.3 Importancia y aplicaciones de la selección del sexo en la producción bovina

En la producción animal, donde la predeterminación del sexo es una herramienta extremadamente útil desde un punto de vista productivo, la obtención de hembras de reemplazo con alta calidad genética no es fácil, y aunque en explotaciones de ganado lechero casi todas las hembras se conservan como posibles futuros reemplazos, los productores desearían controlar la proporción de sexos de las crías, buscando predominantemente hembras y de esa manera incrementar el tamaño de población de la cual seleccionar (Thibier, 2005, Zamudio *et al*, 2004).

Por otra parte, históricamente la ganadería ha dependido de los adelantos tecnológicos para mejorar su eficiencia, calidad y producción, dándole así al ganadero opciones para éstos progresos (Seidel, 2003).

Thibier en el 2005 enumera los avances en las tecnologías reproductivas en cuatro generaciones:

- 1) La primera generación de biotecnologías reproductivas desarrollada en el campo de la investigación fue la inseminación artificial en los años 1950.
- 2) La segunda generación de estas técnicas fue la transferencia de embriones, en 1975, dentro de ésta, se puede mencionar el saxado del semen.
- 3) La tercera generación, incluye el sexado de embriones (1990), fertilización in vitro (1992) y la clonación (1994).
- 4) La cuarta generación es la transgénesis (2000).

Interesantemente se ha observado que la proporción de crías macho provenientes de transferencia de embriones es mayor que la de hembras; mientras que cuando las crías provienen de inseminación artificial, la proporción de machos y hembras es similar. Entre los factores estudiados en relación con la transferencia de embriones, sólo la época de recolección influyó en la proporción de sexos, observándose mayor cantidad de machos cuando los embriones se recolectaron en el verano, lo cual puede estar relacionado con las condiciones ambientales que alteran la fisiología del animal (Zamudio *et al*, 2004, Garner y Seidel, 2003) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Proporción de crías machos nacidos de 1988 a 1993 provenientes de transferencia de embriones, según la estación del año.

Estación del año	n	Crías machos (%)
Primavera	241	51.04b
Verano	267	61.42a
Otoño	251	55.77ab
Invierno	227	53.30ab

Valores con diferentes literales son diferentes ($p \leq 0.05$)

Zamudio *et al*, 2004

Por otra parte, los nacimientos de machos en el ganado lechero tienen un valor monetario muy bajo y significan mantener gestaciones que disminuyen la productividad y aumentan los costos de producción. Contrariamente, en el sistema de producción de carne el nacimiento de hembras no dan la misma ganancia económica que los machos, ya que estos últimos crecen más rápida y eficientemente (Martins, 2007).

Para los productores de leche existen dos rubros que les preocupan, la producción de leche que es su fuente primaria de ingresos y la producción de animales para la matanza eventual. Característicamente tales granjeros producen sus propias novillas de reemplazo e intentan mejorar el mérito genético, para la producción de la leche en sus hatos, comprando el semen de los toros producidos y seleccionados para esa área de producción especializada. Esta necesidad crea así la oportunidad para la explotación comercial de la tecnología del semen sexado, aunque en ambos tipos de ganado leche y carne, se necesita en ocasiones de manera particular machos, mientras que otras veces se requieren hembras (Hohenboken, 1999, Maxwell *et al*, 2004, Resende, 2007).

2.4 Sexado de espermatozoides por citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que se inició en la década de 1970 y principios de 1980, con la finalidad analizar y separar poblaciones celulares. Este equipo fue modificado para ser empleado en la separación de espermatozoides, de acuerdo a la diferente cantidad de ADN de los portadores del cromosoma X y de Y (ver Gráfica 1).

En el caso de los bovinos la diferencia en la raza Jersey es de 4.22%, en la Angus es de 4.07%, en la Herford es de 3.98%, en la Holstein es de 4.01% y en la Brahman es de 3.73% (Jonson y Welch, 1999, Garner, 2001, Garner, 2006, Bo *et al*, 2007).

Con esta tecnología el semen se incuba con un colorante que tiñe el ADN de los espermatozoides (Hoechst 33342), el cual tiene la particularidad de emitir una fluorescencia cuando es sometido a la luz láser, a mayor cantidad de ADN mayor fluorescencia. Para poder detectar la diferencia de fluorescencia y separar los espermatozoides deseados, el citómetro de flujo consiste en un circuito cerrado de alta velocidad de flujo de líquidos que permite alinear y “leer” a los espermatozoides individualmente en microgotas a una velocidad de alrededor 80 kilómetros por hora. La fluorescencia que produce cada espermatozoide teñido es procesada por un software que permite al operador seleccionar la población espermática con mínima o máxima luminosidad, según el sexo que se quiera separar. Los espermatozoides elegidos son cargados eléctricamente, desviados del flujo original en un campo magnético y finalmente recolectados en un tubo para su posterior congelación (Schenk y Seidel, 1999, Garner y Seidel, 2000, Seidel, 2007, Oses *et al*, 2007).

Por otra parte, para asegurar el éxito de la inseminación empleando el semen sexado por citometría de flujo a dosis bajas se requiere utilizar novillas, además de condiciones de manejo del ganado excelentes o experimentales y personal calificado; observándose que en las vacas lecheras en lactancia no se han alcanzado porcentajes de gestación aceptables en campo (Resende, 2007) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentajes de gestación, en novillas empleando semen sexado y semen congelado como control.

Número de espermatozoides	Sitio	Número de novillas	Número de gestantes	% de gestaciones
1- 1.5 x 10 ⁶	Cuerpo	298	155	52.0
1- 1.5 x 10 ⁶	Cuerno	193	107	55.4
3 x 10 ⁶	Cuerpo	171	93	54.4
3 x 10 ⁶	Cuerno	72	43	59.7
20 x 10 ⁶ Control	Cuerpo	255	173	67.8

Schenk y Seidel, 1999

Como se mencionó, actualmente el sexado de semen ha llevado al diseño de citómetros especiales modificados específicamente para este fin, y aunque el sistema parece ser el más eficiente para la separación de los espermatozoides X o Y, presenta desventajas entre las cuales están el elevado precio de las células sexadas, para con ello compensar los costos de producción; bajo número de espermatozoides viables después del proceso: disminución de los parámetros de fertilidad y; la necesidad de contar con personal altamente capacitado (Jonson y Welch, 1999, Seidel, 2003, Hohenboken, 1999, Resende, 2007, Garner, 2001).

En otras palabras, si bien es cierto que el proceso de comercialización del semen sexado ha avanzado, esto ha sido lentamente debido a tres razones principales: la complejidad de la tecnología a implementar; el alto costo de producción (por ejemplo el precio en Estados Unidos del citómetro para el sexado es de 300,000 dólares); y sobre todo por la menor tasa de gestación que se obtiene en comparación con el semen convencional (aunque es una herramienta valiosa en aquellas explotaciones donde se pueda tolerar 20% de disminución en la tasa de gestación aún aplicada a novillas) Seidel, 2003, Seidel, 2006, Schenk *et al*, 2009, Frijters, 2009).

2.5 Separación de espermatozoides por centrifugación en gradientes de densidad

2.5.1 Fundamento teórico de la técnica de separación

En términos generales, el objetivo de la centrifugación es la separación y aislamiento de células o partículas subcelulares de una solución y es considerada como una técnica suave ya que puede preservar la función de las células separadas. La técnica se basa en el movimiento de las partículas suspendidas en un medio líquido al ser impulsadas por la fuerza centrífuga que tiende a desplazarlas hacia fuera del centro de rotación; la sedimentación de dichas partículas se verá afectada por las propiedades de las mismas y por la viscosidad de la solución, (Pertoft, 2000, Alberts, 2006, Mathews, 2006).

La centrifugación se puede utilizar para una amplia gama de aplicaciones ya sea en bioquímica, biología celular o molecular y en medicina; por ejemplo esta técnica se emplea en el aislamiento de células espermáticas viables, para su uso en la fertilización *in vitro*, tanto en el humano como en bovinos. También es obligatorio su uso en el aislamiento de otro tipo de células o de los componentes celulares (mitocondrias, ribosomas, núcleos, lisosomas) que requieren no sólo estar altamente purificados, sino además con sus funciones y viabilidad biológicas preservadas (Pertoft, 2000, Luminita, 2005).

De manera general, una partícula sedimenta a cierta velocidad por acción de la gravedad, proceso llamado sedimentación natural, ello debido a que la partícula dentro del fluido está sometida principalmente a tres tipos de fuerzas que rigen su movimiento que son:

1. (P) Peso de la partícula
2. (Fe) La fuerza debida al empuje de Arquímedes (flotación)

3. (Fa) La fuerza originada por el movimiento del cuerpo dentro del fluido (fuerza de arrastre), en éste último se toma en cuenta la viscosidad del medio (Vilchis, 1998) (Figura 1).

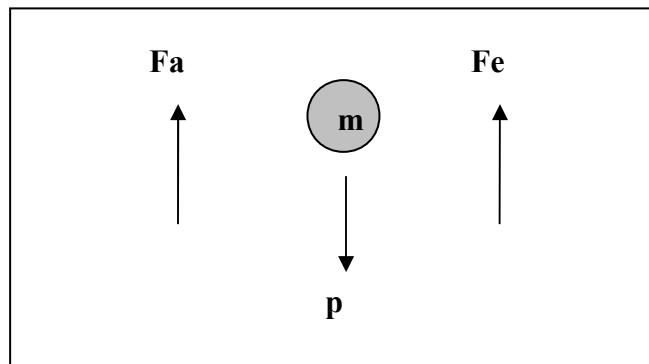


Figura 1. Fuerzas que rigen el movimiento de una partícula dentro de un fluido.

En donde la fuerza neta (F) que actúa sobre la partícula en suspensión es:

Fuerza neta = Peso de la partícula – Fuerza de Arquímedes – Fuerza de arrastre (Vilchis, 1998).

Varios de los principios básicos de la sedimentación se derivan de la Ley de Stokes para la sedimentación natural, que dice: si una partícula está en reposo y su densidad es mayor que la del fluido, la fuerza dirigida hacia abajo será mayor que la fuerza dirigida hacia arriba y debido a esa fuerza neta, la partícula caerá hacia el fondo con una velocidad cada vez mayor. Sin embargo ésta velocidad tiene un límite, ya que la fuerza de arrastre irá creciendo hasta llegar el momento en que la fuerza neta sobre la partícula sea cero. Así la velocidad a la que una molécula o partícula sedimenta se define como coeficiente de sedimentación, como se mencionó, esto dependerá de las propiedades de partícula y del medio. Para aumentar la velocidad de sedimentación, la fuerza de gravedad puede sustituirse por una fuerza centrífuga que permite crear una gravedad artificial (Fritsch, 1975, Chang, 1986, Vilchis, 1998).

Por conveniencia los cálculos del coeficiente de sedimentación de una partícula se realizan en un medio a 20° C considerándose partículas redondas con diámetro y densidad conocidas (Pertoft, 2000).

2.5.2 Tipos de centrifugación:

Centrifugación:

- . Diferencial
- . Con gradiente de densidad
 - . Zonal
 - . Isopícnica

La centrifugación diferencial, separa las partículas en base a su tamaño, se utiliza para la obtención de organelos subcelulares y macromoléculas parcialmente puros, donde se obtienen dos fracciones: una pastilla que contiene el material sedimentado y un sobrenadante con el material no sedimentado (Fritsch, 1975, Chang, 1986).

La centrifugación en gradiente de densidad consiste en la separación de las partículas en función de su densidad de flotación. La separación de las partículas se logra por su sedimentación a través de un gradiente de densidad e implica la utilización de un soporte fluido; el gradiente se logra empleando un compuesto de bajo peso molecular, en el cual las partículas de la muestra se suspenderán. Existen dos variaciones dentro de la centrifugación en gradiente de densidad: la centrifugación zonal y la centrifugación por equilibrio de densidad o isopícnica, ambos métodos son semianalíticos (Fritsch, 1975, Chang, 1986).

La expresión "gradiente de densidad" designa a la pendiente de la curva que describe la densidad del medio de sedimentación en función de la distancia al eje del rotor. Sin embargo, es práctica común en bioquímica llamar a todos los medios "gradiente de densidad de sedimentación" en los que se produce un cambio de densidad y son utilizados ambos términos indistintamente (Fritsch, 1975).

La separación zonal aprovecha el volumen y la masa de las partículas para su sedimentación, por lo que la separación de las macromoléculas será en función de su velocidad de sedimentación. La densidad del medio de sedimentación debe ser siempre menor que la densidad de las macromoléculas. Las aplicaciones más comunes incluyen: la separación de organelos celulares o de proteínas (como los anticuerpos).

Hay criterios que se deben de tomar en cuenta para que tenga éxito este tipo de separación:

- La densidad del diluyente utilizado no debe ser mayor a la menor densidad del gradiente.
- La densidad de las partículas utilizadas no debe ser menor a la de los gradientes.
- El gradiente debe tener una longitud de trayectoria suficiente para la separación.

- El tiempo es esencial, si las centrifugaciones son muy largas, todas las partículas se pelletizan en el fondo del tubo (Pertoft, 2000).

En la separación isopícnica, las partículas son separadas con base en su densidad, este tipo de separaciones se lleva a cabo en un gradiente de densidad en el que las partículas de una densidad en particular flotan durante la centrifugación al alcanzar una posición donde la densidad de la solución que las rodea es exactamente igual a la de ellas, una vez que se alcanza este equilibrio, la longitud de la centrifugación ya no influye en la migración de partículas. Este método es muy utilizado para la separación de ácidos nucleicos. Algunos puntos importantes para que tenga éxito este tipo de separación son:

- La densidad de las partículas a separar debe estar dentro de los límites de las densidades de los gradientes.
- Se admite cualquier longitud del gradiente.
- El tiempo de ejecución debe ser suficiente para que las partículas se agrupen en el punto isopícnico.

Por otra parte, en ambas técnicas se utilizan solutos para la formación del gradiente. Este se seleccionará según las necesidades, es decir, se elegirá uno u otro teniendo en cuenta que deben de tener ciertas características para formar un gradiente de densidad ideal:

- El intervalo de densidad utilizado debe ser suficiente como para separar las partículas de interés.
- El gradiente formado debe de ser isosmótico si la muestra a separar es sensible a la presión osmótica.
- El soluto no ha de interferir con el método de ensayo empleado.
- El soluto se podrá eliminar del producto purificado
- Deberá ser barato y de fácil adquisición
- Esterilizable
- No tóxico ni inflamable.
- De bajo peso molecular.
- No deben alterar las células o partículas separadas.
- No penetrar en las partículas.
- Buena solubilidad en agua (Fritsch, 1975 y 2007, Chang, 1986).

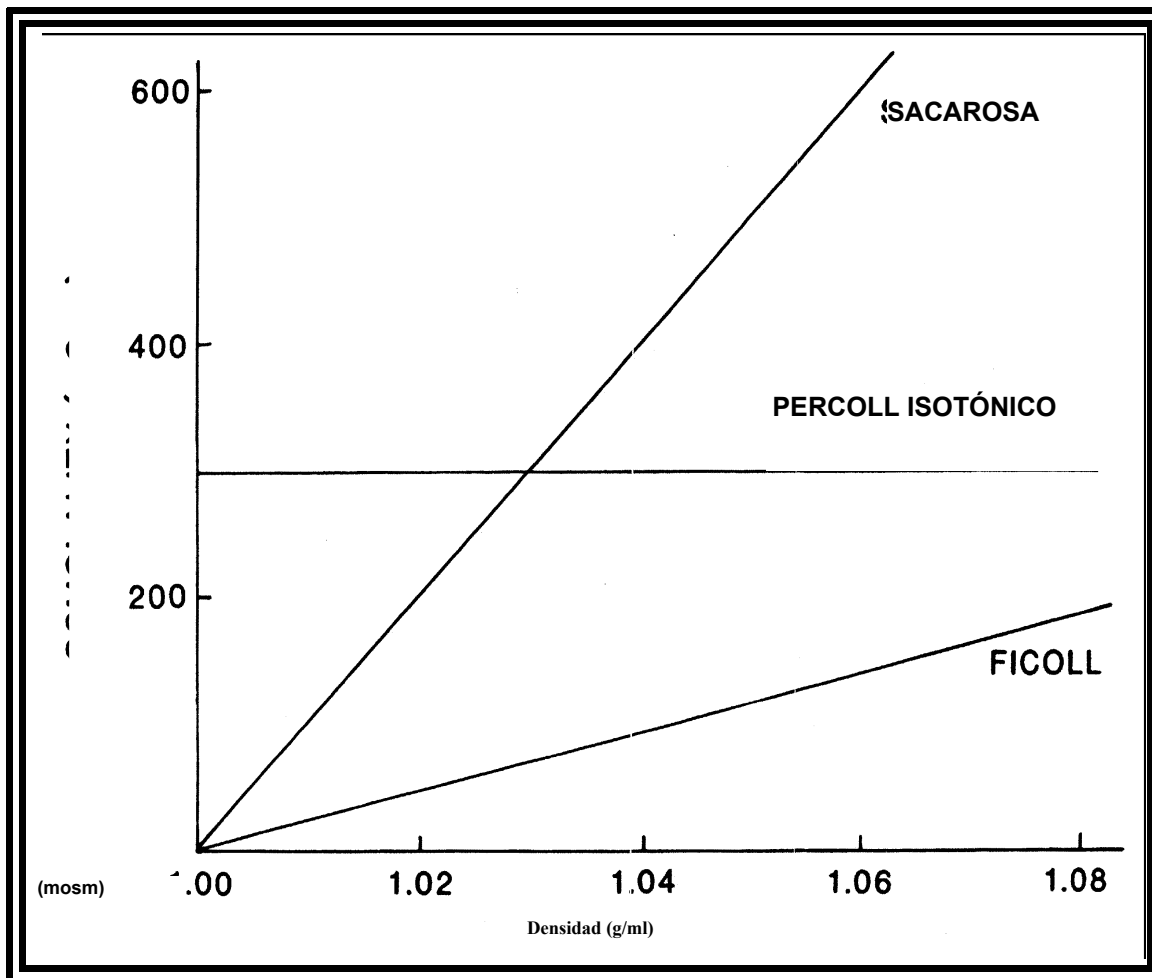
Algunos de los solutos empleados en la elaboración de gradientes de densidad son:

Sacarosa: Por sus características es empleado, en la separación y purificación de materiales biológicos mediante centrifugación zonal, así como en el estudio de proteínas. Sin embargo presenta una alta viscosidad, lo que no le permite alcanzar densidades elevadas. Además la molécula es 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 pueden hacer soluciones con una densidad de hasta 1.28 g / cm^3 , pero se vuelve muy viscosa en densidades superiores a 1.10 g / cm^3 (Fritsch, 1975, Pertoft, 2000).

Ficoll: Es un polisacárido sintético de alto peso molecular (400 kDa), presenta un alto contenido de grupos hidroxilo por lo que tiene una buena solubilidad en medios acuosos, no presenta grupos ionizables que puedan servir de unión a las muestras, es estable a pH neutro y alcalino, puede ser esterilizado en autoclave sin degradarse, no altera la presión osmótica del medio, para mantener la condición iso-osmótica es necesario la adición de otra sal. Debido a sus propiedades, el Ficoll se ha utilizado para la separación de células y partículas subcelulares mediante centrifugación zonal. Las soluciones de Ficoll por debajo del 20% son equivalentes a una densidad de 1.07 g/cm^3 a 1.100 g/cm^3 (Pertoft, 2000, Luminita, 2005, Valdés, 2007).

Percoll: Es una suspensión de partículas de 3 – 15 nm de sílice coloidal revestidas de un derivado de polivinilo (polivinilpirrolidona), presenta baja viscosidad a densidades elevadas, prácticamente no afecta la presión osmótica del medio, con una densidad aproximada de 1.13 g / ml . Se le puede añadir alguna sal fisiológica para obtener una osmolaridad constante y es estable a pH entre 5 y 10. El compuesto puede ser utilizado para centrifugaciones zonales en gradientes preformados, o bien para centrifugación isopícnica (Pertoft, 2000).

En la Figura 2 se observa la comparación de las osmolaridades entre los tres solutos mencionados: sacarosa, ficoll y percoll, a este último se le agregó una sal para mantener una osmolaridad invariable (Pertoft, 2000)



Pertoft, 2000

Figura 2. Variación en la osmolaridad, de la sacarosa, Ficoll y Percoll, ajustando la osmolaridad del Percoll a 300 mOsm.

2.5.3 Separación de espermatozoides por centrifugación en gradientes de densidad

La técnica de sexado de semen por centrifugación también toma como base para la separación la diferencia del contenido de ADN entre los espermatozoides X y Y. Como se menciona, en diversos estudios han demostrado la existencia de mayor contenido de ADN en los espermatozoides portadores del cromosoma X en relación a los Y, lo que resulta en una diferencia de densidad de 0.0007g/cm^3 o 0.06% y, aunque esta diferencia es mínima, esto se refleja en su peso y tamaño, por lo que los espermatozoides X al ser más pesados sedimentarán más rápido que la otra población, permitiendo el enriquecimiento de esta población después del proceso de centrifugación. Además este proceso presenta la ventaja

de no manipular demasiado a la célula espermática, lo que permite mantener su integridad y con esto su viabilidad (Martins, 2007, Resende, 2007 y 2009).

La separación de espermatozoides portadores del cromosoma Y o X, mediante centrifugación en gradientes de densidad ha generado interés y controversia desde su primer reporte, siendo Ericsson y colaboradores, quienes en 1973, utilizando la sedimentación de espermatozoides humanos en gradientes de albúmina sérica bovina, reportaron haber separado una fracción rica (63%) de espermatozoides portadores del cromosoma Y. Posteriormente, Martins en 2003, reporta la separación espermatozoides de bovino portadores del cromosoma X, con una pureza de 81%, y manteniendo una viabilidad comparable a la de espermatozoides no sexados. Por su parte Resende en 2007, obtuvo por fertilización *in vitro* 62% de embriones hembras de bovino validados por PCR. (Winsor, 1993, Flaherty y Colin 1997, Martins, 2007, Resende, 2007).

Shastri en 1977, reportó el enriquecimiento del 72% de espermatozoides Y de humanos, utilizando un gradiente de densidad con Ficoll y metrizoato de sodio (1.04 – 1.08 g/ml de densidad) y centrifugación de 100 gravedades durante 20 minutos, la validación se realizó por la presencia del cuerpos fluorescentes en el cromosoma Y con la tinción de quinacrina. En el Cuadro 4, se presentan algunos estudios realizados para separar a las poblaciones espermáticas (X o Y) empleando la centrifugación por gradiente de densidad.

Algunos autores han mencionado que, el uso de la centrifugación para enriquecer cualquiera de las dos poblaciones de espermatozoides no se ha generalizado debido a que no provee el 100% de confianza y a que los resultados obtenidos son en ocasiones confusos, contradictorios e irrepetibles (Shastri, 1977, Flaherty y Colin 1996).

Cuadro 4. Resultados obtenidos por diferentes investigadores, utilizando centrifugación en gradientes de densidad para separar las poblaciones espermáticas.

Autor	Medio	Gravedades/ tiempo de centrifugación	Densidades	% Pureza	Validación
Martins, 2003	Percoll	500/15 mins	1.110g/ml- 1.123g/ml	81%	PCR
Resende, 2007	Percoll	500/15 mins	1.110g/ml- 1.123g/ml	62%	PCR
Shastry, 1977	Ficoll- Metrizoato de sodio	100/20 mins	1.04g/ml- 1.08g/ml	72%	Cuerpos F
Vázquez, 2008	Ficoll- Diatrizoato de sodio	100/20 mins	1.04g/ml- 1.08g/ml	> 80%	PCRtr

No obstante, de los procedimientos ensayados, el descrito por Lizuka en 1987, muestra los resultados más sobresalientes empleando un gradiente discontinuo de Percoll de 12 capas, reportando la obtención de poblaciones con el 94% de espermatozoides portadores del cromosoma X, desafortunadamente el Percoll presenta la desventaja de ser tóxico para las células, lo cual interfiere en parámetros como la viabilidad, motilidad y fertilidad. Recientemente, Vázquez, en 2008, utilizando un gradiente de densidad con Ficoll-Diatrizoato de sodio en semen de bovino obtuvo fracciones ricas con más del 80% de espermatozoides portadores del cromosoma X, validados por PCRtr (Vázquez, 2008).

2.6 Criopreservación espermática

El proceso de sexado del semen, generalmente se realiza en un lugar fijo que puede estar alejado de las explotaciones ganaderas, por lo que es necesario su criopreservación.

La criopreservación es una biotecnología que permite el almacenamiento del semen por tiempo prolongado, especialmente la de alto valor genético, sin embargo aunque su propósito es garantizar la sobrevivencia de los espermatozoides durante el proceso se puede ocasionar daño irreversible a la membrana plasmática, lo que ocasiona ya sea la muerte de la célula o cambios parecidos a los que se ven durante la capacitación espermática. Estos daños

dificultan o disminuyen la capacidad de los espermatozoides para interactuar con el ovocito durante la fertilización; aún con las mejores técnicas de congelación sólo 40 a 50% de los espermatozoides son viables después del proceso. Se sabe que durante la congelación el espermatozoide sufre cambios osmóticos, deshidratación y formación de hielo; procesos a los que se ve expuesto nuevamente durante al descongelado. También es sabido que la concentración del crioprotector, la velocidad de enfriamiento y de descongelación contribuyen a incrementar el estrés al que es sometido el espermatozoide, siendo el reflejo de todo ello las alteraciones morfológicas en las membranas espermáticas o alteraciones estructurales (Rodríguez - Martínez, 2000, Felipe, 2006, Martínez *et al*, 2006, Aceves, 2008, Barrientos *et al*, 2009, Gutiérrez, 2009).

La membrana plasmática y las membranas que envuelven a los organelos como mitocondrias y acrosoma, son vulnerables a los procesos de congelación y descongelación, por lo que el aumento de la concentración de solutos y la formación de cristales intracelulares, puede dar como resultado el rompimiento o modificación de estas membranas, contribuyendo con ello a la pérdida de viabilidad de la célula espermática. Por lo que valorar el nivel de impacto de estas alteraciones sobre la funcionalidad de las células, requiere de pruebas dinámico-fisiológicas que revelen el grado verdadero de daño sufrido después de la congelación-descongelación (Flores, 2005, Mejía, 2005, Felipe *et al*, 2006, Gutiérrez, 2009). En otras palabras, la baja fertilidad del semen descongelado es un importante factor de pérdida económica durante un proceso de inseminación artificial, por lo que para evitarlo la viabilidad del semen debe ser evaluada después de su procesamiento (Galina y Valencia, 2008, Morán y Díaz, 2006).

Las técnicas de congelación de semen son tan ampliamente usadas que casi son universalmente conocidas. Así, el requisito del uso de crioprotectores y medios diluyentes durante el almacenaje son con el fin de que las células espermáticas se conserven viables, para que lleguen íntegras al momento de la fertilización y que así la criopreservación sea solo "una pausa en el proceso que delimita la continuidad en el desarrollo de los espermatozoides con un período de animación suspendida que finalmente conducirá al éxito de la fecundación" (Vishwanath, 2000, Felipe, 2006, Galina y Valencia, 2008).

Cada uno de los diferentes componentes de los que constan los medios de dilución ha sido investigado separadamente o en combinación, esto con la finalidad de maximizar la viabilidad y la fertilidad de espermática después de la descongelación, generalmente contienen:

- 1) Una fuente de energía en forma de azúcares simples, glucosa o fructosa son los más utilizados para espermatozoides de bovinos.

2) Un amortiguador que permita el mantenimiento de la osmolaridad y el pH, generalmente Tris o Test.

3) Glicerol, como crioprotector, ya que penetra dentro de la célula espermática y evita la formación de cristales de hielo intracelular. Se sabe que el glicerol debe ser utilizado en concentraciones bajas en la mayoría de las especies domésticas, en bovinos del 6 al 8%.

4) Una fuente de lipoproteínas de bajo peso molecular, por ejemplo, yema de huevo o leche descremada, para proporcionar estabilidad a la membrana plasmática de los espermatozoides.

5) Antibióticos para proporcionar protección bacteriostática y bactericida como son entre otros: tilosina, gentamicina, espectinomina, lincomicina (Vishwanath, 2000, Mejía, 2005, Felipe, 2006, Aceves, 2008, Gutiérrez, 2009).

Aunque la mayoría de las compañías que procesan semen para la inseminación artificial (IA) preparan sus propios diluyentes adaptándolos según sus necesidades, también existen en el mercado diversos medios diluyentes para la criopreservación tal es el caso de Triladyl, ampliamente utilizado en semen bovino, ovino y en diferentes especies silvestres sobre todo de rumiantes como son: búfalos, gacelas y ciervo rojo. Además el Triladyl tiene la ventaja de ser un medio diluyente de un paso por lo que se puede utilizar a nivel de campo (Vishwanath, 2000, Mejía, 2005).

Cabe mencionar que los procesos de congelación y descongelación afectan una gran proporción de espermatozoides, en la práctica existe una gran variación entre individuos, por lo que el semen de algunos sementales se ve menos afectado que el de otros, por ende para cada toro se podrá calcular el número límite de espermatozoides por dosis de inseminación, que garantice un porcentaje de fertilidad adecuado, lo que finalmente definirá cada individuo (Rodríguez-Martínez 2000, Gadea, 2001).

2.7 Evaluación de la integridad funcional de los espermatozoides

Los espermatozoides se encuentran entre las células más pequeñas y más especializadas del cuerpo, tienen como finalidad principal transportar su material genético y alcanzar al ovocito hasta el sitio de fecundación para fertilizarlo y de esa manera iniciar el desarrollo de un nuevo individuo. Estos se caracterizan por tener una cabeza aplanada portadora del núcleo con el material genético altamente condensado, una cola o flagelo y están cubiertos por completo por la membrana plasmática. El acrosoma o casquete acrosómico, es una estructura especializada de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción

anterior de la cabeza del espermatozoide, contiene enzimas entre las que se han identificado: hialuronidasa, neuroaminidasa, aril sulfatasa, acrosina, fosfatasa ácida, fosfolipasa A y la β -N acetilgluco-saminidasa. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con su cola, la cual se divide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Fawcett, 1995, Hafez, 2000, Thibodeau, 2008). En el espermatozoide que se encuentra en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal (con su borde apical), la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas (Rodríguez Martínez, 2000, Martínez *et al*, 2003, Felipe, 2006, Aceves, 2008)

En el caso de los espermatozoides de los mamíferos el manejo y la aplicación de procedimientos como el sexado por citometría, la centrifugación, la criopreservación o dilución implican el retiro del plasma seminal, cuya función no sólo es ser el vehículo en el que se encuentran los espermatozoides sino que también les proporciona soporte metabólico (fuente de energía). Además contiene factores proteicos específicos que influyen en la funcionalidad y capacidad fertilizante de los mismos. Se ha señalado que la eliminación de plasma seminal podría causar la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide, favoreciendo la aparición de estados de precapacitación o capacitación no funcional; acortándose así la vida útil de las células y dando por resultado su muerte prematura (Maxwell *et al*, 2004, Maxwell y Johnson, 1999, García, 2007, Garner, 2006, Felipe *et al*, 2006).

La capacidad fecundante de los espermatozoides se ha definido como la habilidad que tienen estas células para fecundar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto, sin embargo, tras esta sencilla definición hay un complejo proceso que incluye una serie de fases en las que el espermatozoide debe presentar las cualidades adecuadas para poder fecundar al ovocito (Gadea, 2001).

El análisis de laboratorio del semen para que sea útil debe tener las siguientes características: ser poco susceptible de error humano, repetible, exacto, rápido y barato (Graham, 2001, Hafez, 2000)

La evaluación de la viabilidad y la estimación de la motilidad son de los parámetros más usados para valorar la fisiología espermática ya que son técnicas de rápida aplicación. La integridad de la membrana plasmática es el parámetro más estudiado para valorar la viabilidad de las células, ya que no sólo es fundamental para el metabolismo espermático, sino también para que se lleven adecuadamente la capacitación y reacción acrosomal, procesos importantes en la capacidad fertilizante de estas células; se utilizan de manera rutinaria tinciones supravitales, como la eosina-nigrosina que penetra al interior de la célula

sólo si la membrana se encuentra dañada, y se considera una técnica útil, confiable, rápida y económica para ésta evaluación (Bamba, 1988, Graham, 2001, Flores, 2005, Aceves, 2008, Felipe *et al*, 2008).

La membrana además de ser estudiada desde el punto de vista estructural mediante la utilización de tinciones, puede también valorarse desde el punto de vista funcional, para lo que se ha aplicado la prueba hiposmótica junto con las tinciones supravitales. La prueba dinámica fisiológica o prueba hiposmótica, cuyo principio se basa en el proceso de ósmosis, consiste en someter a los espermatozoides a condiciones de presión osmótica más baja que la fisiológica. Bajo condiciones fisiológicas, los medios de manipulación de las células espermáticas deben de tener una presión osmótica de 300 mOsm/Kg. Cuando se somete a los espermatozoides a un medio en el que hay una variación de dicha presión, éstos responden ante ella intentando equilibrar el desfase osmótico entre el interior de la célula y el medio. Así, si el medio presenta una presión más baja (hiposmótico), las células espermáticas incorporarán agua del medio a su interior, mientras que si la presión es mayor (hiperosmótico), liberarán agua del interior al medio externo, por lo que durante la prueba hiposmótica, los espermatozoides bioquímicamente activos permitirán la entrada de agua y mostrarán diferentes grados de turgencia en un esfuerzo por mantener el equilibrio entre la presión osmótica interna con la del medio externo; la entrada de agua provoca en las células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo, mientras que las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo (Bamba, 1988, Rodríguez Martínez, 2000, Ramalho, 2007, Graham, 2001 Gutiérrez, 2009, Gordon, 2004, De Jonge, 2006, Samardžija, *et al* 2008).

Adicionalmente el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal ha sido utilizado como un parámetro para evaluar la función espermática y la respuesta a la criopreservación en varias especies incluyendo el bovino, por lo que conviene realizar una valoración específica del mismo. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener baja fertilidad (Correa y Zavos, 1994, Martínez *et al*, 2003, Aceves, 2008, Felipe, 2006).

Finalmente hay que asumir que las características de los eyaculados varían ampliamente tanto entre diferentes machos como entre diferentes eyaculados de un mismo individuo, ya sea en semen fresco o congelado, por lo mismo la fertilidad también variará. Además de que un número importante de factores puede influir en la producción y características espermáticas y provocar variaciones en la calidad seminal y en su capacidad fecundante,

entre estos destacamos la estación del año, el nivel de nutrición, la raza, la edad y el estado sanitario (Gadea 2001, Graham, 2001, Maxwell *et al*, 2004).

III Justificación

El sexado de los espermatozoides debiera tener un enorme impacto sobre la eficiencia de los programas de reproducción para permitir la producción de las crías del sexo pre-seleccionado (Hohenboken,1999, Bo *et al*, 2008).

Actualmente la citometría de flujo es una técnica de selección de semen que permite separar las poblaciones espermáticas X y Y con una pureza del 85 al 90%, pero al mismo tiempo disminuye la viabilidad de las células (Pérez, 2006, Garner, 2004, Maxwell *et al*, 2004, Maxwell y Johnson 1999, Martins, 2007, Schenk *et al*, 2009).

La separación por centrifugación en gradientes de densidad ha sido utilizada con éxito para separar diversos tipos celulares o componentes subcelulares, por lo que podría ser un proceso adecuado para generar semen sexado con capacidad de fertilización satisfactoria (Luminita. 2004, Shastry, 1977, Vázquez, 2008, Resende, 2009); lo cual podría inducir a que un número mayor de ganaderos se iniciaran en los programas de IA con semen sexado para beneficiarse con el incremento de la producción del sexo deseado en las crías descendientes de sus hatos (Hohenboken,1999, Resende, 2009).

El presente trabajo de investigación tomó como base la metodología descrita para el proceso de separación de espermatozoides de bovino mediante medios físicos reportado por Vázquez en 2008, donde se obtuvo más del 80% de espermatozoides portadores del cromosoma X, validados por PCRtr, sin embargo en dicho estudio, no se hizo la evaluación de la viabilidad espermática.

IV Hipótesis:

La centrifugación en gradientes de densidad con un medio a base de Ficoll-Diatrizoato de sodio, para separar la población de espermatozoides del semen de bovino, permitirá mantener su integridad y viabilidad por lo que podrán ser criopreservados.

V Objetivos:

Objetivo general:

Mantener la viabilidad de semen bovino después de ser sexado mediante centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-Diatrizoato de sodio para someterlos al proceso de criopreservación.

VI Objetivos específicos:

1. Someter al semen de bovino a la técnica de centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-Diatrizoato.
2. Realizar pruebas de viabilidad al semen antes y después de la centrifugación.
3. Criopreservar el semen sexado.
4. Realizar pruebas de viabilidad al semen sexado descongelado.

VII Material y métodos:

Diseño experimental y procedimientos

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron eyaculados de siete toros, dos de raza Holstein, pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la UNAM, y cinco toros del Centro de procesamiento de semen RECA, ubicado en el Estado de Querétaro; dos de ellos de la raza Suizo americano y tres Holstein.

El proceso inicial se hizo siguiendo la metodología reportada por Vázquez en 2008, realizándose 5 repeticiones en las cuales como parámetro de viabilidad se tomó la motilidad progresiva, sin embargo en todos los casos no se observó ninguna motilidad. Por lo que se decidió revisar cada uno de los pasos de dicho protocolo para ver qué factor era el que estaba afectando dicho parámetro. Para ello fueron utilizados los eyaculados de los toros pertenecientes a CEPIPSA, empleándose en total 30 eyaculados (15 de cada toro) para dicho propósito. Se evaluaron medios de dilución para el transporte y manejo de la muestra, así como temperatura y número de lavados realizados, para posteriormente utilizarlos durante la investigación.

Una vez estandarizada la metodología, se tomó un eyaculado por toro para su procesamiento, siendo siete en total los que se evaluaron.

Ya sea para la estandarización o para la fase de experimentación, todas las muestras se obtuvieron mediante el empleo de vagina artificial, a una temperatura de 38-42° C y se transportaron al laboratorio de morfología de la FMVZ, en un termo en una cama de agua a 37° C, protegidas de la luz y permitiendo que el semen se atemperara al ambiente. Las muestras obtenidas en el Estado de Querétaro se trabajaron en el mismo laboratorio del Centro de procesamiento.

Estandarización del procesamiento de la muestra para su separación

A) Para transportar el semen se evaluaron distintos medios diluyentes añadiéndose a éste un volumen igual al de los eyaculados obtenidos. Los medios utilizados fueron yema de huevo al 5% en PBS, leche semidescremada, medio mínimo de cultivo (MMC) y PBS, el parámetro evaluado en todos los casos fue la motilidad progresiva y se realizaron 3 repeticiones de cada uno. La determinación del porcentaje de motilidad progresiva se realizó por observación directa bajo el microscopio de luz, modelo 490678 para ello se colocaron una gota de cada una de las muestras diluidas en un portaobjetos precalentado a 37° C, se cubrió con un cubreobjetos y se asignó un porcentaje según el desplazamiento progresivo que presentaron los espermatozoides. La meta fue obtener como mínimo 80% de motilidad.

Los resultados promedios obtenidos con el empleo de los diferentes medios de transporte se presentan en el Cuadro 5.

La selección de la yema de huevo se basó en que algunos autores mencionan que ésta proporciona sustratos energéticos, o lipoproteínas de baja densidad que le dan protección térmica a las células espermáticas y se puede incluir desde un 2 al 5% (Maxwell *et al*, 2004, Hafez, 2000). No fue utilizada como medio de transporte, porque al evaluar la motilidad no alcanzó el porcentaje esperado de 80%, además de que era difícil retirarla de la muestra, y ello estaría interfiriendo en el paso de los espermatozoides por el gradiente.

Se sabe que la leche como diluyente mantiene la fertilidad del semen bovino, (Vishwanath, 2000, Maxwell *et al*, 2004), pero al igual que la yema de huevo, fue necesario lavar a las células 5 veces para eliminarla, por lo que al valorar la motilidad progresiva, no alcanzó la mínima requerida.

El amortiguador de fosfato salino (PBS) se evaluó, ya que sería el utilizado para en el lavado de la muestra y para realizar el gradiente de densidad, sin embargo la motilidad no fue la pretendida.

El MCM es un medio energético, simple de hacer y fácil de retirar de la muestra; su composición se presenta en el Cuadro 6. La motilidad progresiva obtenida en éste medio cayó dentro del porcentaje esperado (82.5%), comparable con lo obtenido por Gutiérrez, en 2009.

B) Durante el manejo de la muestra de espermatozoides, se observó que había un cambio drástico en la temperatura, a partir de la toma a 37.5° C, a la llegada al laboratorio a 24° C y durante su procesamiento de 37° C a 18° C. Se realizaron 10 repeticiones y se registró la temperatura, al llegar al laboratorio y al final del proceso de separación de las células en el gradiente de densidad, evaluándose la motilidad progresiva de las células en cada caso; los resultados se presentan en el Cuadro 7. Se decidió trabajar a temperatura ambiente y de esa manera tratar de evitar el cambio brusco de temperatura al pasar al Baño María a las células, se realizaron 3 ensayos para evaluar la motilidad bajo las temperaturas alcanzadas. Los resultados se presentan en el cuadro 8.

Cuadro 5. Porcentaje de motilidad progresiva obtenido en los diferentes medios de transporte evaluados (3 repeticiones de cada uno).

Medio	Promedio de motilidad progresiva (%)
PBS	75
Leche	65
Huevo	60
MMC	82.5

Cuadro 6. Composición del medio mínimo de cultivo (MCM).

Reactivo	mM
NaCl	108.08
NaHCO ₃	25.07
CaCl ₂	1.71
Piruvato de sodio	0.25
Lactato de sodio	20.00

(Gutiérrez, 2009).

Cuadro 7. Promedio del porcentaje de motilidad obtenida utilizando Baño María durante el manejo de la muestra (10 repeticiones).

	Temperatura	(%) Motilidad
Al tomar la muestra	37° C	-
Al llegar al laboratorio	24° C	80
Durante el manejo	37° C	-
Al final de la separación y lavado de las células	18° C	-
Al final del proceso	37° C	30

Cuadro 8. Promedio del porcentaje de motilidad obtenida sin utilizar Baño María durante el proceso de la muestra (3 repeticiones).

	Temperatura	(%) Promedio de Motilidad
Al tomar la muestra	37° C	-
Al llegar al laboratorio	24° C	80
Durante el manejo	23° C	-
Durante la separación y lavado de las células	18° C	-
Al final del proceso	23° C	45

C) Se evaluaron el número de lavados de la muestra, realizándose 4, 2 antes y 2 después del proceso de sexado, pero se observó que al final del proceso, bajo nuestras condiciones mostraron disminución de la motilidad espermática (10 repeticiones), por lo que siguiendo las recomendaciones de algunos autores (García, 2007, Maxwell y Johnson, 1999) se decidió realizar 3 repeticiones con solo un lavado, en cada paso y evaluar la motilidad al final (Cuadro 9), de esta manera el tiempo del proceso también disminuyó, lo que aunado a los

puntos anteriores, permitió mantener la motilidad progresiva, después del sexado en 45% en promedio.

Cuadro 9. Promedio de motilidad progresiva obtenido con 2 (3 repeticiones) y 4 (10 repeticiones) lavados de la muestra.

Número de lavados a las muestras	Promedio de motilidad progresiva (%)
4	30
2	45

D) Mantenimiento de la viabilidad después del sexado para la criopreservación

El medio de dilución para la congelación que se seleccionó, fue el Triladyl, considerando que es el más ampliamente empleado para la crioconservación de semen bovino, por la protección térmica que confiere a la célula y el aporte energético; este contiene: TRIS – fructuosa – ácido cítrico, 6.6% glicerol, antibióticos (lincomicina, gentamicina y tilosina). La proporción en que se prepara es 20% de Triladyl, se le adiciona 20% de yema de huevo y 60% de agua tridestilada (Vishwanath, 2000, Aceves, 2008). Con este diluyente se obtuvo una motilidad progresiva en promedio del 63% al descongelar las muestras (Cuadro 10).

El otro medio de dilución para la congelación, utilizado en el Centro de procesamiento de semen RECA que es también ampliamente utilizado fue: leche descremada, antibióticos (gentamicina 0.25 g/L, tilosina 0.05 g/L y 0.3 g/L de espectinomicina), 8% de glicerol, con el cual se obtuvo una motilidad de 73% al descongelar las muestras (Cuadro 10) (Vishwanath, 2000, Martínez *et al*, 2006).

Cuadro 10. Promedio de motilidad progresiva al descongelar, utilizando 2 medios diferentes de congelación (3 muestras de cada uno).

Medio	Promedio de motilidad progresiva (%)
Triladyl (yema de huevo)	63
Leche descremada y glicerol	73

Una vez estandarizado el manejo de la muestra, el diseño experimental se realizó en cuatro fases, que se describen a continuación.

Primera fase: Valoración de la viabilidad e integridad celular.

Al llegar al laboratorio se evaluó la temperatura de las muestras, estas llegaron de 22 a 26° C y el trabajo se realizó a temperatura ambiente del laboratorio (22 a 26° C).

Las valoraciones que describen a continuación se realizaron antes del proceso de sexado, después de sexado y después del proceso de descongelación de las muestras.

a) Valoración del porcentaje de motilidad progresiva:

La determinación del porcentaje de motilidad progresiva se realizó como se mencionó anteriormente, por observación directa bajo el microscopio, colocando una gota de la muestra diluida en un portaobjetos precalentado a 37° C, se cubrió con un cubreobjetos y se asignó un porcentaje según el desplazamiento progresivo que presentaron los espermatozoides.

Después de la evaluación de la motilidad, las muestras espermáticas fueron divididas en 2 partes, una para ser utilizada para las evaluaciones de viabilidad e integridad y la otra para ser sexada.

b) Determinación del porcentaje de viabilidad espermática con tinción vital eosina-nigrosina.

La viabilidad se valoró mediante la técnica de eosina nigrosina, modificada por Bamba (1988), para lo que se diluyó la muestra al 25% en PBS y colocando 8:1 con la tinción

eosina-nigrosina (eosina amarilla 0.67g, nigrosina 5g, 40 ml glucosa al 5% y agua desionizada c.b.p. 100 ml) atemperada a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se elaboraron frotis, se dejaron secar al aire y se montaron con cubreobjetos para su evaluación a un aumento de 100x. Se contaron 200 células, diferenciándose las teñidas, que se consideraron muertas puesto que el colorante penetró al interior por alguna discontinuidad de la membrana celular, mientras que los espermatozoides que mantuvieron la membrana plasmática intacta se observaron transparentes y se consideraron vivos (Figura 3) (Bamba, 1988, Gutiérrez, 2009).

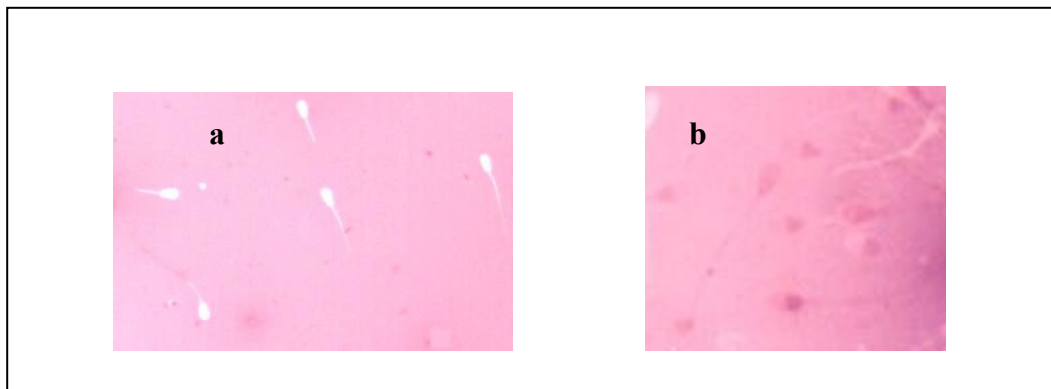


Figura 3. Imágenes de los espermatozoides evaluados con tinción de eosina-nigrosina a): espermatozoides vivos transparentes b): espermatozoides muertos teñidos. 40X

c) Prueba dual de resistencia hiposmótica / azul brillante de Coomassie (HOST/BBC).

Con el objeto de valorar la integridad funcional de la membrana, se lavó la muestra por centrifugación (2500rpm/5 min) en PBS para retirar el diluyente y se reconstituyó en el mismo, a una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml, se colocaron en alícuotas 100 μ l de esta muestra y fueron adicionadas con 100 μ l de solución hiposmótica (4.9 g de citrato de sodio, 9 g de fructosa por litro de agua desionizada). Las muestras se incubaron por 60 min a 37.5 °C, pasado el tiempo de incubación se fijaron en paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el fijador lavando con PBS dos veces por centrifugación a 2500 rpm y se reconstituyó en cloruro de amonio (50 mM en PBS) para

después realizar frotis que se dejaron secar al aire y se tiñeron con solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie Blue G -250 de Fisher Scientific al 0.22 %, Metanol 50%, ácido acético al 10 %, agua bidestilada c.b.p.), por 10 a 15 min, para remover el exceso de colorante se lavaron utilizando agua bidestilada y se dejaron secar al aire (Gutiérrez, 2009). Una vez secas se montaron con cubreobjetos. Para la evaluación se contaron 200 células por laminilla bajo el microscopio a un aumento de 100x empleando el objetivo de inmersión.

Para la evaluación de la prueba se consideró como positivos o vivos, a los espermatozoides que presentaron flagelos doblados, enrollados, en ovillo y en látigo (Figura 4), los que se observaron con colas rectas se consideraron negativos, muertos o dañados (Figura 5).

Tinción con el azul brillante de Coomassie (BBC)

A una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml, se colocaron en alícuotas 100 μ l de esta muestra y fueron adicionadas con 100 μ l de paraformaldehído al 4 % en agua desionizada y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador lavando con PBS dos veces por centrifugación a 2500 rpm y se reconstituyó en cloruro de amonio (50 mM en PBS) para después realizar frotis que se dejaron secar al aire, posteriormente se sumergieron en solución de azul de Coomassie, fueron retirados y lavados utilizando agua bidestilada para remover el exceso de colorante.

Se interpretó la integridad acrosomal como: íntegro, cuando el acrosoma se observó bien definido e intensamente teñido; dañado o ausente cuando el acrosoma se observó difusamente teñido, con pérdida de continuidad y/o pérdida de material o ausente (Figura 4)

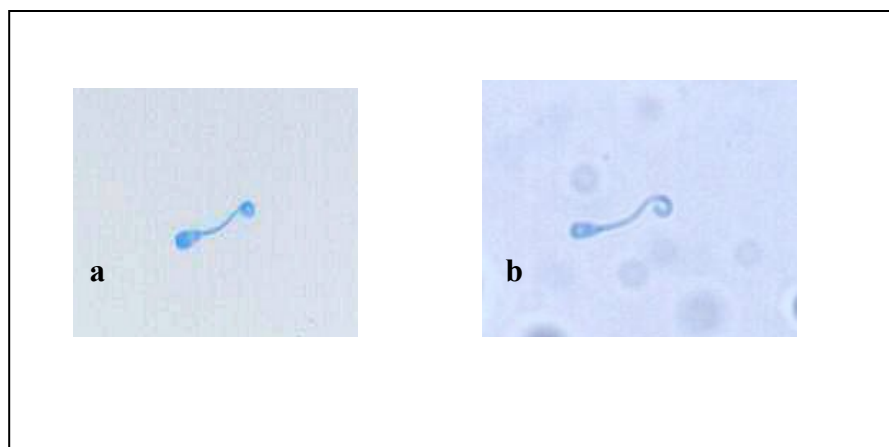


Figura 4. Imágenes de espermatozoides evaluados con la Prueba dual de resistencia hiposmótica / azul brillante de Coomassie (HOST/BBC)

a): espermatozoide vivo B): espermatozoide muerto 40X

a



b



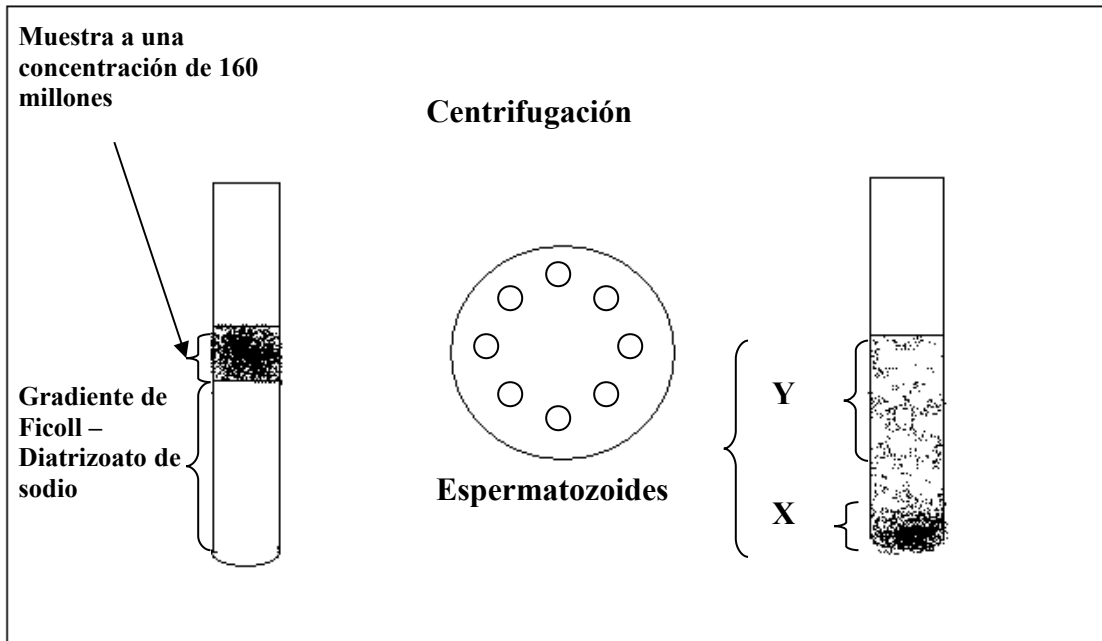
Figura 5. Imágenes de los espermatozoides evaluados con tinción de azul de Coomassie a): espermatozoide transparente vivo con acrosoma b): espermatozoide teñido muerto sin acrosoma. 40X

Segunda fase: Sexado del semen

Para el sexado las muestras se procesaron como sigue (esquema 1):

1. Las muestras fueron lavadas en amortiguador de fosfato salino (PBS) a 2500 rpm por 5 minutos, con el fin de retirar el plasma seminal y resuspenderlas finalmente en el mismo.
2. Lavada la muestra se determinó la concentración espermática mediante conteo doble empleando un hemocitómetro y se ajustó a 160×10^6 células / ml en PBS.
3. Se colocó con gentileza 1 ml de muestra espermática sobre un colchón hecho con 2.4ml de Ficoll (SIGMA, F4375 – 100G) al 8% en PBS adicionado con 1ml de Diatrizoato de sodio (SIGMA, S4506 – 100G) al 32% en PBS, previamente colocado y mezclado en un tubo de ensayo de vidrio de 10 ml y diámetro interno de 1cm.
4. Posteriormente se centrifugaron a 700 rpm durante 20 minutos, a continuación la pastilla se recuperó y se reconstituyó en 3ml de PBS, para lavarse por centrifugación a 2500 rpm, desechando el sobrenadante.
5. La mitad de la muestra se utilizó para su evaluación y la otra mitad para congelarlas.
6. Las muestras fueron valoradas empleando la prueba HOST/BBC y la tinción de eosina – nigrosina, como se mencionó anteriormente.
7. Las muestras a congelar, se resuspendieron en el medio de congelación a una concentración total de 20 millones de espermatozoides.

8. Finalmente se evaluó la motilidad progresiva a un aumento total de 20x, en un microscopio compuesto



Esquema 1. Proceso de sexado de semen por centrifugación en gradiente de densidad.

Tercera fase: Criopreservación

Se utilizaron 2 protocolos para congelar las muestras:

Protocolo 1. El medio de congelación fue preparado como sigue: 60% agua tridestilada, 20% yema de huevo y 20% Triladyl con antibióticos.

Al semen sexado se le determinó la concentración espermática, mediante conteo doble en hemocitómetro, el semen fue diluido en el medio de congelación a temperatura ambiente y envasado en pajillas de 0.5 ml a una concentración de 20×10^6 / ml. Las pajillas fueron colocadas en gobeletes y estos en bastones que se dejaron en refrigeración a 4° C durante 3 horas, como periodo de equilibrio. Después se colocaron sobre una rejilla y se expusieron a vapores de nitrógeno durante 15 minutos y posteriormente se sumergieron en el nitrógeno líquido para ser almacenadas a -196° C.

Protocolo 2. Para este protocolo se utilizó la técnica de dos pasos, para lo cual, como primer paso el semen fue diluido en leche descremada con antibióticos a temperatura ambiente y se

colocó dentro de una cámara fría a 5° C durante dos horas, posteriormente se adicionó igual volumen del mismo diluyente adicionado con glicerol al 8%, se envasaron en pajillas de 0.5 ml a una concentración de 20×10^6 /ml, enseguida se introdujeron en gobeletes y estos en bastones, se colocaron sobre una rejilla por 30 minutos a 4° C, posteriormente se colocaron a vapores de nitrógeno 15 minutos para enseguida sumergirlos en nitrógeno líquido y almacenarlos a -196° C.

Cuarta fase: Descongelación y evaluación del semen.

Después de transcurridos 15 días de almacenaje en el nitrógeno líquido, se descongelaron dos pajillas de cada muestra para su evaluación, para ello las pajillas fueron sumergidas en baño María a 37.5° C durante 30 segundos. Enseguida se le realizaron todas las valoraciones antes mencionadas.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS y con un comparativo de medias por T de student para muestras pareadas. Fue utilizado para calcular diferencias estadísticas entre el semen no sexado, sexado y después del proceso de criopresevación. Donde los puntos evaluados incluyeron motilidad espermática, viabilidad e integridad de los acrosomas.

VIII Resultados:

En el Cuadro 1 se presenta la viabilidad de los espermatozoides al emplear la tinción de eosina-nigrosina. El promedio fue del 86.28% de espermatozoides vivos antes del sexado, después del sexado 80.57%, en las muestras descongeladas no sexadas 78% y en las muestras sexadas descongeladas fue del 72.71%. La diferencia en la viabilidad ($P < 0.05$), entre los espermatozoides no sexados y los sexados fue significativa y entre las muestras sexadas y las descongeladas sexadas.

Cuadro 11. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides vivos en el semen no sexado, en el sexado, en el descongelado no sexados y en el descongelado sexado.

Toro	No sexado (%)	Sexado (%)	Descongelado no sexado (%)	Descongelado sexado (%)
1	80	70	75	62
2	88	74	79	60
3	90	88	75	78
4	90	85	79	75
5	82	80	80	78
6	85	79	80	78
7	89	88	78	78
Promedio	86.28^a	80.57^b	78^b	72.71^c

Valores con diferentes literales son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

La valoración de la motilidad progresiva se presenta en el Cuadro 2, en el que se puede observar que el promedio del porcentaje de motilidad antes del proceso de separación de las poblaciones de espermatozoides X y Y, fue del 91.42%, disminuyendo dicho porcentaje después del sexado de los espermatozoides a 71.42% ($P < 0.05$) así como después del proceso de descongelación, en ambos tipos de muestras (no sexadas y sexadas), los resultados fueron 70% y 59.42%, respectivamente ($P < 0.05$).

Cuadro 12. Promedio de motilidad progresiva y por toro de los espermatozoides por toro y en promedio, no sexados, sexados, descongelados no sexados y descongelados sexados.

Toro	No sexado (%)	Sexado (%)	Descongelado no sexado (%)	Descongelado sexado (%)
1	80	50	55	48
2	90	40	70	32
3	95	80	75	65
4	95	85	70	68
5	90	83	75	70
6	95	80	70	65
7	95	82	75	68
Promedio	91.42^a	71.42^b	70^b	59.42^c

Valores con diferentes literales son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

La valoración de la integridad de membrana plasmática y del acrosoma de los espermatozoides no sexados, mediante la prueba dual de resistencia hiposmótica/ azul brillante de Coomassie (HOST/BBC), se muestra en el Cuadro 3, el promedio fue de 61% de espermatozoides vivos con acrosoma, en las muestras antes del sexado. Esta misma evaluación en las muestras después de sexadas fue de 45.42%. Los resultados promedio mostraron diferencias ($P < 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 13. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides no sexados, vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma

Toro	Vivo con acrosoma (%)	Vivo sin acrosoma (%)	Muerto con acrosoma (%)	Muerto sin acrosoma (%)
1	56	24	8	12
2	56	23	9	12
3	65	23	5	7
4	62	23	4	11
5	62	24	6	8
6	63	22	5	10
7	63	22	4	11
Promedio	61	23	5.85	10.14

Cuadro 14. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides sexados, vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma.

Toro	Vivo con acrosoma (%)	Vivo sin acrosoma (%)	Muerto con acrosoma (%)	Muerto sin acrosoma (%)
1	35	30	10	25
2	40	24	8	28
3	48	27	8	17
4	49	26	9	16
5	47	26	8	19
6	49	28	7	16
7	50	26	7	17
Promedio	45.42	26.71	8.14	19.71

Los resultados de la prueba HOST/BBT, de las muestras descongeladas no sexadas y sexadas se muestran en los Cuadros 5 y 6. Observándose que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma fue mayor en las muestras descongeladas no sexadas ($P < 0.05$) (Cuadro 5).

Cuadro 15. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides descongelados no sexados, vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma.

Toro	Vivo con acrosoma (%)	Vivo sin acrosoma (%)	Muerto con acrosoma (%)	Muerto sin acrosoma (%)
1	46	23	8	23
2	44	24	6	26
3	50	23	7	20
4	51	22	6	21
5	48	21	6	25
6	49	21	8	22
7	47	20	8	25
Promedio	47.85	22	7	23.14

Cuadros 16. Porcentaje promedio y por toro de espermatozoides sexados descongelados vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos con acrosoma.

Toro	Vivo con acrosoma (%)	Vivo sin acrosoma (%)	Muerto con acrosoma (%)	Muerto sin acrosoma (%)
1	30	26	10	34
2	25	28	9	38
3	42	29	10	19
4	43	26	8	23
5	41	28	10	21
6	40	29	9	22
7	45	30	9	16
Promedio	38	28	9.28	24,71

En el Cuadro 7, se presentan los promedios obtenidos para los parámetros evaluados, se muestran la diferencias estadísticas que existieron durante el proceso en los diferentes parámetros valorados. Observándose la diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las muestras no sexadas y después de ser sexadas, así como entre las muestras no congeladas y después de ser descongeladas, tanto en la motilidad, viabilidad e integridad de acrosomas.

Cuadro 17. Porcentaje promedio de la motilidad progresiva, de espermatozoides vivos, vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma en las muestras de espermatozoides no sexados, sexados, descongelados no sexados y descongelados sexados.

Parámetro	No sexado (%)	Sexado (%)	Descongelado no sexado (%)	Descongelado sexado (%)
Motilidad progresiva	91.42^a	71.42^b	70^b	59.42^c
Vivos*	86.28^a	80.57^b	78^b	72.71^b
Vivos con acrosoma**	61^a	45.42^b	47.85^b	38^b
Vivos sin acrosoma**	23^a	26.71^a	22^a	28^b
Muertos con acrosoma**	5.85^a	8.14^b	7^a	9.28^b
Muertos sin acrosoma**	10.14^a	19.71^b	23.14^b	24.71^b

*Tinción eosina-nigrosina; ** Prueba dual de resistencia hiposmótica/ azul brillante de Coomassie (HOST/BBC)
Valores entre líneas con diferentes literales son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)

La Figura 6, muestra el comportamiento de las muestras en promedio durante de las evaluaciones a lo largo del estudio (motilidad progresiva, viabilidad e integridad de membrana y acrosomas), antes del sexado, después de sexado y después de descongelar las muestras, así como el control.

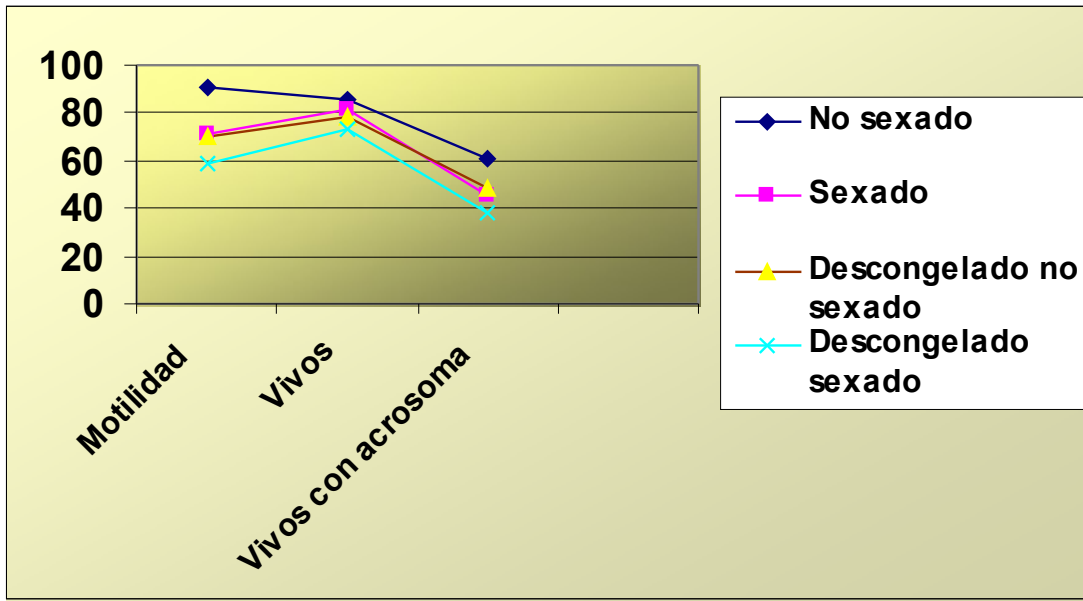


Figura 6. Evaluaciones de las muestras, antes del sexado, después del sexado y después del descongelado de las muestras sexadas y no sexadas.

IX Discusión

Se sabe que los métodos de preparación, dilución y la manipulación de los espermatozoides tienen una importante influencia sobre su viabilidad y la fertilidad posterior, por ejemplo la dilución excesiva puede llevar a la pérdida permanente de la movilidad o de la actividad metabólica y por lo tanto de la capacidad de fertilización *in vivo*, de éstas células (Maxwell Y Johnson, 1999, Hernández, 2007). Debido a lo anterior ninguna técnica por sí sola puede predecir con exactitud la fertilidad de una muestra de espermatozoides, por lo que el examen de diversas características físicas del semen puede determinar mejor el potencial de fertilidad de las células (Hafez *et al.* 2000). Así la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides es uno de los elementos básicos del análisis del semen. Sin embargo aunque la evaluación

de la motilidad es especialmente importante, en las muestras donde muchos espermatozoides están inmóviles, no necesariamente esto significa que estén muertos, por lo que se hace necesario el uso de otras técnicas con la finalidad de distinguir entre espermatozoides inmóviles muertos y los espermatozoides vivos inmóviles (Bjorndahl *et al.* 2003). Existen varios métodos de evaluación de la viabilidad del semen, entre los que mayormente se emplean se encuentra el uso de la tinción eosina-nigrosina. En el presente trabajo la evaluación de la viabilidad espermática después del proceso de separación mediante gradientes de Ficoll-Diatrizoato y posteriormente al descongelado de las mismas, empleando la tinción de eosina-nigrosina, mostró que un alto porcentaje de espermatozoides se mantienen vivos (80.5% y 72.71%). Schenk, *et al.*, en 2009, utilizando citometría de flujo, reportaron del 32.6 al 43.5% de espermatozoides vivos después del descongelado del semen sexado, con una motilidad progresiva de 36.4 al 44.6%, en el cual mencionan que estos valores son adecuados para emplear a las células en inseminación, coincidiendo con éste último estudio en el sexado por citometría de flujo, Carvalho *et al.* en 2010, obtuvieron una motilidad del 29.6 y 26.2% con 37% de espermatozoides vivos igualmente al descongelado. Usando esta misma técnica de sexado, Blondin *et al.* (2009), obtuvieron 57% de motilidad en el semen sexado y 46% al descongelado. En el presente estudio los porcentajes promedio de motilidad fueron de 72.4% y 59.4%, respectivamente. Adicionalmente, utilizando gradientes continuos de densidad para la separación de las poblaciones espermáticas, Resende en 2007 y 2009, obtuvo 80% y 79% de espermatozoides vivos con una motilidad del 77.5% y 73% respectivamente, no realizando la congelación del semen; siendo así los resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo en este tipo de muestra. Comparando los resultados anteriores tal parece que el método de centrifugación en gradientes de densidad causa menor daño a las células, debido posiblemente a la menor manipulación que se le da a los espermatozoides. A éste respecto Carvalho *et al.* en 2010, menciona que durante el proceso de sexado al espermatozoide tal vez lo dañe la exposición al láser, la alta velocidad a la que se recogen las células, las cargas eléctricas o la temperatura antes del proceso.

Por otra parte existen controversias con respecto al daño que ocasiona la centrifugación sobre las células espermáticas, Resende (2007, 2009) y Machado *et al.* (2009), mencionan que al utilizar el método de centrifugación en gradientes de densidad se obtienen valores de motilidad comparados al semen convencional y al mismo tiempo autores como García, 2007 y Maxwell *et al.*, 2004, mencionan que cualquier manejo que se realice a los espermatozoides incluyendo la centrifugación, irá en detrimento de su viabilidad. Así, para obtener una mejor

valoración de las muestras espermáticas sometidas al proceso de sexado y criopreservación en nuestro estudio se evaluó la integridad de la membrana plasmática y al mismo tiempo el estado del acrosoma, empleándose para el primer caso la prueba hiposmótica y para el segundo el azul de Coomassie. Con este tipo de valoración sólo 45.4% y 38% de espermatozoides vivos con acrosomas íntegros, respectivamente, fueron observados. Empleando la misma técnica de gradientes de densidad Resende, en 2007 y 2009, reportan haber obtenido 24.9%, y 19% de espermatozoides vivos con acrosomas íntegros, respectivamente para cada año, por lo que el procedimiento de separación realizado en el presente estudio mostró mejores resultados. Blondin *et al*, (2009), utilizando citometría de flujo obtuvieron 46% de espermatozoides vivos e íntegros después del sexado y 28% al descongelar las células, Carvalho *et al* en 2010, obtuvieron con ésta misma técnica de sexado, 37% de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro al descongelado, por lo que los resultados en el presente trabajo fueron comparables a éstos estudios. Sin embargo, después del sexado con la técnica de citometría de flujo Jonson y Welch (1999), publicaron haber obtenido 40% de espermatozoides vivos con acrosomas íntegros, lo cual comparado con los presentes resultados son similares, no obstante que el equipo en este caso es diferente y menos sofisticado.

Por otra parte la pérdida de viabilidad, motilidad e integridad acrosomal, observada en el semen después del proceso de criopreservación posiblemente se deba a que no todos los espermatozoides son capaces de resistir el proceso de la congelación-descongelación, se sabe que después de este proceso se pierden hasta el 50% de espermatozoides aún en semen convencional (Jonson y Welch, 1999, García, 2007, Felipe, 2008, Blondin *et al*, 2009). No obstante a lo anterior, los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de los rangos aceptados tanto en el semen sexado como en el semen sexado descongelado. Aunque se sabe que las mejores pruebas para la viabilidad espermática son la inseminación artificial, y la fertilización *in vitro* (Vishwanath, *et al*, 2000, Rodríguez – Martínez, 2000, Carvalho *et al*, 2010).

Finalmente el proceso de separación con la técnica empleada en el presente estudio, en comparación con la citometría de flujo, tiene la ventaja de consumir poco tiempo, ya que la separación se realizó en 20 min, lográndose obtener un porcentaje aceptable de espermatozoides íntegros y viables (38%), con un método práctico, por lo que se podrían utilizar dosis altas de espermatozoides. Actualmente por citometría de flujo se clasifica el semen bovino, separando de 9 a 14×10^6 espermatozoides por sexo/hora por lo cual es

necesario utilizarlo a dosis bajas (2 millones de espermatozoides) para inseminación artificial (Oses *et al*, 2009, Schenk *et al*, 2009, Frijters *et al*, 2009, Carvalho *et al*, 2010).

X Conclusiones

1. Se logró el transporte del semen de bovino para su empleo en gradientes de densidad de Ficoll-Diatrizoato de sodio en el laboratorio.
2. Se estandarizó la técnica de separación de los espermatozoides de bovino en gradientes de densidad de Ficoll-Diatrizoato de sodio, permitiendo obtener valores adecuados de espermatozoides viables para su criopreservación (80.5% de espermatozoides vivos, con una motilidad progresiva de 71.4% y 45.4% de espermatozoides vivos con acrosoma íntegros).
3. El proceso de separación permitió obtener concentraciones espermáticas adecuadas para que el semen fuera criopreservado a las dosis comerciales (20×10^6).
4. La viabilidad de los espermatozoides sexados después de la criopreservación (72.7% de espermatozoides vivos, con una motilidad progresiva de 59.4% y 38% de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro) resultó aceptable para su posible aplicación en inseminación artificial.
5. La técnica HOST/BBC puede ser usada como un método rápido para evaluar al mismo tiempo la integridad de la membrana así como la del acrosoma.
6. Falta por comprobar el enriquecimiento de la población X portadora de hembras a nivel de campo (Vázquez en 2008, reporto que éste método contiene un enriquecimiento del 80% de espermatozoides portadores del cromosoma X, validado PCRtr).

XI Bibliografía:

1. Aceves A. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide de bovino. (Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal México): FMVZ. UNAM, 2008.
2. Alberts B. Molecular biology of the cell. 3^a ed. Barcelona. España: Médica Panamericana, 2006.
3. Bamba K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa y bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. Theriogenology 1988; 29: 1245-1251.
4. Barrientos M, Juárez M ML, Trujillo ME, Montiel F. Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca perinuclear en semen criopreservado de verraco. Zoot. Trop 2009;27(1): 17-24.
5. Bjorndahl L. Soderlund I. Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Hum Reprod 2003;18:813-816,.
6. Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King W. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. Theriogenology 2009; 71: 30–38.
7. Bo G, Cutaia L, Veneranda G. Semen sexado una herramienta tecnológica para el tambo. Producir XXI 2008;15(188):52-57.
8. Carvalho J, Sartori R, Machado M, Mourão G, Dode M. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. Theriogenology 2010;74:1521–1530.
9. Chang R. Fisicoquímica con aplicaciones a sistemas biológicos. Editorial Continental, México 1986.
10. Correa J, Zavos P. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. Theriogenology 1994;42:351-360.
11. Cruz M. Evaluación de la eficiencia de un equipo de citometría de flujo y de dos fluorocromos para el sexado de semen congelado de bovino. (Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal México): FMVZ UNAM 2005.
12. De Jonge. The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Edited by Christopher J. De Jonge and Christopher L. R. Barratt. Cambridge University Press, 2006.
13. Fawcett D. Tratado de histología. Mc Graw Hill 12^a ed. España, 1995.
14. Felipe Y, Valencia J, Juárez M. Determinación del porcentaje de espermatozoides de bovino con capacidad fertilizante antes y después del proceso de congelación. Departamento de Morfología y Departamento de Reproducción, FMVZ, UNAM. México, 2006.

15. Felipe Y. Caracterización bioquímica de las proteínas extraídas de la taca perinuclear antes y después de la congelación del semen bovino. (Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal México): FMVZ UNAM, 2006.
16. Flaherty S, Colin D. Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Mol Hum Reprod* 1996;2(12):937 – 942.
17. Flores GHF. Efecto del enfriado lento hasta – 5° C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. (Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal México): FES - C UNAM, 2005.
18. Frijters A, Mullaart E, Roelofs R, Hoorne P, Moreno J, Moreno O, Merton J. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 2009;71:64–67.
19. Fritsch A. Centrifugal Separations in Molecular and Biology. EU: Rick Wood Bernie, Mackay Ltd, 2007.
20. Fritsch A. Preparative density gradient centrifugations. Departement de Biologie Moleculaire. Francia: Institut Pasteur, 1975.
21. Gadea J. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro*. *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim* 2001:16 (1).
22. Gadella B. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci* 2008;107:229–236.
23. Galina C, Valencia J. Reproducción de Animales Domésticos. 3ª ed. México: LIMUSA, 2008.
24. García E. Analysis, function and biotechnological applications of boar seminal plasma proteins PSP- I and PSP – II. (Tesis de Nivel Doctorado). España: Universidad de Murcia, 2007.
25. Garner D. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 2006;65:943 – 957.
26. Garner D, Seidel G. Sexing bull sperm. College of Veterinary Medicine and Biological Sciences, Colorado State University, 2000.
27. Garner D, Seidel G. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 2008;69:886 – 895.
28. Garner D, Seidel G. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Anim. Sci.* 2003; 83: 375–384.

29. Garner D. Sex-Sorting Mammalian Sperm: Concept to Application in Animals. *Journal of Andrology* 2001; 22(4):519-526.
30. Gordon I. *Reproducción Controlada de Ganado Vacuno y Búfalos*. España: Acribia, 2000.
31. Graham K. *Assessment of Sperm Quality*. Department of Physiology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, 2001.
32. Gutiérrez O. *Correlación del daño de la teca perinuclear y la descondensación del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo*. (Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal México): FMVZ. UNAM, 2006.
33. Gutiérrez O. *Valoración in vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, criopreservado en diluyentes formulados con trehalosa y una baja concentración de glicerol*. (Tesis de Nivel Doctorado México): FMVZ. UNAM, 2009.
34. Guyer M. Accessory chromosomes in man. *Biological Bulletin*. University of Cincinnati. 1910: XIX (4)219-234.
35. Hafez E, Dally M, Didion B. Lenz R. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. México: Mc Graw Hill, 2000.
36. Hohenboken W. Applications of sexed semen cattle production. *Theriogenology* 1999;52:1421–1433.
37. Johnson L, Welch G. Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999;52:1323-1341.
38. López D. Sincronización de celo, sexado de semen, transferencia de embriones: porqué y para qué en un sistema de crías. Aspectos claves. www.produccion-animal.com.ar o www.produccionbovina.com.2005.
39. Luminita S. Fractionation of granulocytes from whole human blood by centrifugation. *Romanian J. Biophys.* 2005;14:53–58.
40. Lush JL. The possibility of sex control by artificial insemination with centrifuged spermatozoa. *J. Agric. Res.* 1925;30 (10): 893 - 913.
41. Machado G. Carvalho J. Siqueira E. Caixeta G. Franco M. Rumpf R. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2009;71:1289–1297.
42. Martínez O, Juárez M ML, Hernández J, Valencia J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 2006;66:1969–1975.

43. Martins V. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2007;36:219–228.
44. Mathews C. *Bioquímica*. 3ª ed España: Pearson, 2006
45. Maxwell W, Johnson L. Physiology of Spermatozoa at High Dilution Rates: The Influence of Seminal Plasma. *Theriogenology* 1999;52:1353-1362.
46. Maxwell W, Evans G, Hollinshead F, Bathgate R, Graaf S, Eriksson B, Gillan L, Morton K, O'Brien J. Integration of sperm sexing technology into the toolbox. *Anim Reprod Sci*. 2004;79-95.
47. Medrano A. Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación de semen refrigerado. (Tesis de Nivel Doctorado) España: Universidad Autónoma de Barcelona, 2005.
48. Mejía G. Evaluación de un protocolo de criopreservación de semen, adaptado a fauna silvestre, sobre su criosupervivencia y el efecto de la capacitación prematura. (Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal) México: FMVZ. UNAM, 2005.
49. Morán K, Díaz M. Aplicación de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica (PRH) para predecir la congelabilidad del semen bovino. (Proyecto Especial del Programa de Ingeniero) Honduras: Agrónomo de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, 2006.
50. Moruzzi J. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Reprod. Fert.* 1979;57: 319 – 323.
51. Oses M, Teruel M, Cabodevila J. Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. (Facultad de Ciencias Veterinarias) Argentina. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2009.
52. Palomo M. Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación *in vitro* en el caprino. (Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad Autónoma de Barcelona). España, 1995.
53. Palomo M, Izquierdo D, Mogas T, Paramio M. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 1999;51:927-940.
54. Parrilla I. Avances de la técnica de preselección del sexo en el ganado porcino mediante separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo. (Tesis de Nivel Doctorado): España. Universidad de Murcia, 2005
55. Pérez J. Comparación de la frecuencia de nacimientos de Hembras con el método de inseminación artificial con semen sexado y no sexado de vaquillas holstein - friesland. (Tesis de Nivel Licenciatura) México: FMVZ. UNAM, 2006.

56. Pertoft. H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2000; 44:1–30.
57. Ramalho J, Amaral A, Sousa AP, Rodriguez AS, Martins L, Baptista M, Mota P, Tavares R, Amaral S, Gamboa S. Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. Center for Neuroscience and Cell Biology, Department of Zoology, University of Coimbra 3004-517 Coimbra, Portugal, 2007.
58. Resende M. Separation of X – bearing bovine sperm by centrifugation in continuous percoll and optiprep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. *Ciência Animal Brasileira*. 2009;581-587.
59. Resende M. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade contínuo de percoll e optiprep. (Tesis de Nível Doctorado) Brasil: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Facultad de Ciencias Agrarias e Veterinarias Campus de Jaboticabal, 2007.
60. Rodríguez–Martínez H. Evaluación del Semen Congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. International Veterinary Information Service, 2000.
61. Sarmardzija M, Tomislav Dobranić T, Krušlin S, Cergolj M, Karadjole M, Nikica Prvanović N, Grizelj J. The use of the hypoosmotic swelling test and supravital staining in evaluation of sperm quality in boars. *Veterinarski Arhiv* 2008;78 (4): 279-287.
62. Schenk J, Cran D, Everett R, Seidel G. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 2009;71:717–728.
63. Schenk J, Seidel G. Imminent Commercialization of Sexed Bovine Sperm. Proceedings. The Range Beef Cow Symposium XVI; 1999 December 14, 15, and 16, Greeley, Colorado.
64. Seidel G. Garner. D. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*. 2002; 124: 733–743
65. Seidel G. Sexing mammalian sperm – intertwining of commerce, technology, and biology. *Anim Reprod Sci*. 2003;79:145–56.
66. Seidel G. Sexed sperm. Colorado State University. EU, 2006.
67. Seidel G. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*. 2007;68:443–446.
68. Shastry P, Hegle U, Rao S. Use of Ficoll – sodium metrizoate density gradient to separate human X – and Y – bearing spermatozoa. Institute for Research in Reproduction. *Nature* 1979;269 (56239):58–60.

69. Thibier M. The zootecnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.* 2005;45:235–242.
70. Thibodeau G, Kevin P. Estructura y función del cuerpo humano. 13ª ed España: Evolve, 2008.
71. Valencia JM. Situación actual y perspectivas del sexado del semen. Memorias de XXV Congreso de Buiatría. 2001. Veracruz, México. 87-91.
72. Valdés M. Estudio de la relación bioquímica – funcional entre la melatonina y los péptidos opióides en el sistema inmune de la rata. (Tesis para obtener el grado académico de maestría en Ciencias Biológicas) México: Facultad de Medicina, UNAM 2007.
73. Van Munster, Ron. H, Gerard J, Aten J. Difference in Volume of X- and Y-Chromosome-Bearing Bovine Sperm Heads Matches Difference in DNA Content. *Cytometry* 1999;35:125–128.
74. Vázquez M. Sexaje de espermatozoides de bovino mediante métodos físicos. (Tesis de Nivel Licenciatura) México: FMVZ. UNAM, 2008.
75. Vilchis V. Estudio teórico práctico de la centrifuga del laboratorio marca Westfalia con aplicación en la enseñanza experimental. (Tesis de Nivel Licenciatura) México: Facultad de Química. UNAM, 1998.
76. Vishwanath R, Shanon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci.* 62 (2000) 23-53.
77. Winsor D, Evans G, White I. Sex Predetermination by Separation of X and Y Chromosome-bearing Sperm: A Review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1993, 5, 155-71.
78. Zamudio A, Herrera J, García M, Gallegos J, Sánchez A, Valencia J. Factores que afectan la proporción de sexos en becerros provenientes de transferencia de embriones. *Agrociencia* 2004;38: 405-412.