



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA



---

"CENTRIFUGACIÓN DE SEMEN OVINO PARA SU SEXADO  
EN FICOLL-DIATRIZOATO DE SODIO Y USO EN LA  
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

**YARA GRACIELA ROJAS NAVA**

ASESORES:

MVZ DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

MVZ DR. OCTAVIO VICENTE MEJÍA VILLANUEVA

Ciudad universitaria

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.

## DEDICATORIA

A Dios, porque estuvo siempre  
A mi lado hasta en los momentos  
Más difíciles.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia: mis **Padres**, mis **hermanas** y mi **hermano** que a lo largo de mi vida me han apoyado, he impulsado, ya que son testigos de cuanto me ha costado lograr mi objetivo.

A Dra. **Lourdes Juárez Mosqueda**, por su dedicación, confianza, entrega y entusiasmo para concluir este proyecto, gracias por escucharme, pero sobre todo por permitirme aprender.

Dr. **Octavio Mejía Villanueva**, por darme la oportunidad de iniciar este proyecto, y continuar otro.

MVZ MC **Germán U. López López** por su coparticipación en este proyecto, por tenerme paciencia y el enseñarme las bases para el desarrollo de esta tesis.

Al Hospital de Especialidades Siglo XXI:

A la Dra. **Lourdes Arriaga Pizano** por su amabilidad y por facilitarnos sus instalaciones, QFB MC **Mireille Gutiérrez Mendoza** y QFB MC **Ismael Mancilla Herrera**, por su disposición y colaboración para la conclusión de esta tesis.

Hospital de Pediatría:

Dra. **Rosa Viguera**s y Dr. **Oscar Gutiérrez Pérez** por facilitarme el uso de sus instalaciones, su aprovisionamiento de este trabajo y por enseñarme que siempre se aprende algo nuevo.

MVZ MC **Mayeli M. Nieves Osorno** por tu amistad y porque siempre estuviste ahí para resolver mis dudas.

Gracias a todas las personas que directa e indirectamente contribuyeron para concluir un objetivo más en mi vida y que me han enseñado algo en el camino.

## CONTENIDO

	Resumen. . . . .	1
I.	Introducción. . . . .	3
II.	Revisión de literatura. . . . .	8
III.	Justificación. . . . .	.33
IV.	Hipótesis. . . . .	.34
V.	Objetivos. . . . .	.34
VI.	Material y métodos. . . . .	35
VII.	Resultados. . . . .	50
VIII.	Discusión. . . . .	.64
IX.	Conclusión. . . . .	73
X.	Perspectivas. . . . .	74
XI.	Bibliografía. . . . .	75

## RESUMEN

**ROJAS NAVA YARA GRACIELA.** Centrifugación de semen ovino para su sexado en Ficoll-diatrizoato de sodio y uso en la inseminación artificial. (Asesores: MVZ MC Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, MVZ MPA Dr. Octavio Vicente Mejía Villanueva)

El objetivo de este trabajo fue obtener el enriquecimiento de la población de espermatozoides X del semen de carnero, utilizando para ello la centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio, validando la técnica por inseminación artificial y citometría de flujo.

Se utilizaron 24 borregas (10 de la raza hampshire, con una edad promedio de 1 año y 14 de la raza suffolk, con al menos un parto y edad entre 3 y 4 años), las cuales fueron sincronizadas con esponjas vaginales impregnadas con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA) y al retiro de éstas, inyectadas con 200 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG). Las ovejas del grupo uno (n=10) fueron inseminadas cervicalmente con semen fresco no sexado y las del grupo dos (n=14) fueron inseminadas también cervicalmente pero con semen fresco sexado. Las hembras en ambos grupos fueron inseminadas a celo detectado, con una dosis de  $120 \times 10^6$  de espermatozoides

envasados en pajillas de 0.25 ml. El diagnóstico de gestación se realizó entre el día 30 y 35 después de la inseminación, utilizando para ello el ultrasonido de imagen y el sexo de las crías se determinó al nacimiento. La fertilidad para las ovejas inseminadas con semen sexado fue 50% mientras que para las inseminadas con semen no sexado fue de 60% no habiendo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). La prolificidad entre ambos grupos tampoco fue significativa ( $P > 0.057$ ). El sexo de las crías fue evaluada con una prueba exacta de Fisher, y aunque el número de hembras fue mayor en el grupo 2, no hubo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ).

Al evaluar la técnica con citometría de flujo se obtuvo un 68% de enriquecimiento de la población de espermatozoides X, lo cual es comparable con el número de hembras nacidas por inseminación, por lo tanto los resultados obtenidos sugieren que la centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio produce el enriquecimiento de la población de espermatozoides portadores del cromosoma X; por ello es necesario continuar estandarizando la técnica, así como incrementar el número de hembras inseminadas para lograr obtener diferencias estadísticas.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los mamíferos el sexo está determinado por la presencia de los cromosomas sexuales, siendo los machos heterocigotos (XY) y las hembras homocigotas (XX). En el proceso de división celular de los gametos (meiosis), el material genético debe reducirse y volverse haploide, a fin de que la fecundación restaure el complemento diploide. Durante la meiosis, las hembras sólo producen un tipo de ovocitos que portan el cromosoma X, mientras que los machos producen dos diferentes espermatozoides: los que llevan el cromosoma X y los que llevan el cromosoma Y.<sup>1</sup> Por lo que en otras palabras, la clave de la determinación del sexo es la diferencia de los cromosomas sexuales entre los dos sexos, siendo en el caso de los mamíferos el macho el responsable de ello.<sup>1, 2, 3</sup>

En el caso de los machos, la presencia del cromosoma Y desencadena una serie de eventos fundamentales y temporalmente específicos que garantizan la diferenciación sexual del aparato reproductor, entre los que se encuentran la secreción del antígeno HY, la activación del gen SRY y la secreción de testosterona y dehidrotestosterona.<sup>4</sup> Mientras que la masculinización del

sistema nervioso, a nivel hipotalámico, ocurre gracias a la secreción de estrógenos.<sup>5</sup>

La diferencia en el contenido de DNA entre el cromosoma sexual X y el Y ha sido la base de las tecnologías para el sexado de semen, ya que el cromosoma X contiene más DNA que en el cromosoma Y.<sup>5</sup> Además, existen variaciones entre especies en este contenido, por lo que en los bovinos los espermatozoides X tienen un 3.8% más de DNA que los Y, en los cerdos un 3.6%, en la chinchilla el 7.5%, en los humanos un 2.8%, en conejos el 3.0%, en caballos 3.7% y en los ovinos un 4.2%.<sup>6</sup>

En el área de la zootecnia, el empleo de la selección del sexo a través del sexado de semen puede tener muchas aplicaciones, por ejemplo, en animales de compañía como sería el caso de los caballos, los perros y los gatos, el nacimiento de un determinado sexo puede preferirse por fines emocionales. En el caso de los animales especializados en el deporte, como serían perros y caballos de carreras, se prefieren los machos porque generalmente son más veloces; mientras que en el caso de los animales destinados a actividades cinegéticas (cacería), se prefiere también a los machos por ser más grandes y generar astas o cuernos más vistosos.<sup>7</sup>

Adicionalmente, el sexado de semen podría ser empleado para los nichos biotecnológicos como la producción de animales transgénicos o clonados, ya que podrían tener importantes aplicaciones para el descubrimiento de nuevas drogas y la producción de proteínas específicas, así como para mejorar algunas características productivas o para favorecer la resistencia a enfermedades.<sup>8</sup> En el caso de la fauna silvestre, podría ayudar a la conservación de especies en peligro de extinción, favoreciendo el incremento del sexo deseado en programas de reproducción asistida *in situ*.<sup>8, 9</sup>

Por otra parte, esta tecnología abre campo para la investigación, ya sea para la reducción de costos en la determinación del sexo, en el estudio del manejo y la criopreservación del semen sexado, así como en la determinación de las técnicas para la inseminación artificial y de la cantidad necesaria de espermatozoides sexados, que garanticen una fertilidad adecuada en las hembras inseminadas.<sup>9</sup>

De manera particular en la ganadería, los intentos por determinar el sexo de la progenie se ha convertido en una de las principales metas para mejorar los programas reproductivos, ya que se tiene la necesidad de producir individuos de sexo conocido.<sup>10, 11</sup> La aplicación de esta

tecnología depende del costo, la eficiencia y facilidad de su uso.<sup>11</sup>

Desde hace varios años se han establecido y desarrollado diversas técnicas para la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X o Y, como sería la electroforesis, la velocidad de sedimentación y el enfoque isoeléctrico entre otros.<sup>12</sup> Por ejemplo de los estratos espermáticos separados en columnas de albúmina se obtienen de 75 a 80% de espermatozoides Y, mientras que la filtración en columnas de sephadex enriquece 70-75% la población de espermatozoides X.<sup>13</sup> También, a través de procedimientos inmunológicos se han separado los espermatozoides X y Y, mediante la utilización de anticuerpos contra el antígeno HY, codificado en los espermatozoides portadores del cromosoma Y.<sup>7, 11</sup>

Aunque todos estos métodos están basados en criterios lógicos, no han producido hasta el momento resultados aceptables en la preselección de los espermatozoides. Sin embargo, la determinación de las diferencias en cuanto al contenido de DNA entre los espermatozoides que portan el cromosoma X o Y, permiten el uso de la centrifugación en gradientes de diferente densidad o la citometría de flujo.<sup>14</sup> Esta última se basa en analizar la cantidad de luz emitida por cada espermatozoide, cuando el colorante

con afinidad al DNA (previamente añadido a la célula) es impactado por luz ultravioleta proveniente de un rayo láser. Así, se ha determinado que la fluorescencia de los espermatozoides que portan el cromosoma X es mayor que en aquellos que portan el cromosoma Y, esta diferencia detectada por el equipo de citometría de flujo permite separar a los espermatozoides.<sup>14</sup> Una de las limitaciones de esta tecnología es el reducido número de espermatozoides sexados, ya que el máximo de espermatozoides sexados por hora no es mayor a 4 millones en cada fracción X o Y, lo que implica que producir pajillas de semen sexado para la inseminación artificial es muy lento y costoso.<sup>14</sup>

Recientemente Vázquez<sup>15</sup> realizó un trabajo sobre sexado de espermatozoides de bovino mediante la centrifugación en gradientes de densidad, en donde además utilizó para su validación, técnicas como el PCR-tr, la hibridación *in situ*, la tinción con quinacrina y la densitometría óptica en geles de agarosa. En dicho trabajo menciona que mediante la centrifugación en gradientes de Ficoll-diatrizoato de sodio es posible el enriquecimiento de la población de espermatozoides X.

Con base en lo anterior, se pretende sexar semen en ovinos de pie de cría, mediante la centrifugación en

Ficoll-diatrizoato de sodio, para obtener hembras de reemplazo genéticamente superiores.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Determinación del sexo a través de la historia y la mitología**

La determinación del sexo en la antigüedad contiene una mezcla de conocimientos basados en la mitología o en la superstición<sup>16</sup>, ya que desde entonces se ha buscado una explicación para determinar el sexo masculino y femenino.<sup>17</sup>

La idea de que el semen contiene una fuerza vital es común entre los chinos, los indios, los griegos, así como para los gnósticos y muchos pueblos de Oceanía.<sup>18</sup>

Por ejemplo, en la cultura egipcia el desarrollo de los conocimientos en relación al diagnóstico temprano del embarazo fueron sobresalientes, ellos trataban los granos de trigo y cebada con la orina de las mujeres grávidas y los mezclaban con arena y dátiles: de tal forma que si los granos que germinaban (por la acción de la hormona hCG) eran los del trigo el hijo sería varón, si sólo crecía la cebada sería mujer. Este método tenía una precisión del 40%, y se mantuvo durante largo tiempo,

debido a que Hipócrates lo adoptó y se utilizó en gran parte del mundo.<sup>19</sup>

En la época de la antigua Grecia, la opinión del filósofo Parménides menciona que las semillas que engendran a los futuros hijos se producen exclusivamente en el hombre, que las crea masculinas y femeninas, las primeras del testículo derecho y las segundas en el izquierdo, y normalmente, las masculinas se asentarían en la parte derecha del útero, que es también la masculina, y las femeninas en la izquierda, produciendo un afeminamiento o masculinización del embrión si se sentase el germen en el lado opuesto al de su sexo.<sup>20</sup>

Otro filósofo de esa época, Anaxágoras, también se aventuró a afirmar que los espermatozoides producidos por el testículo derecho daba lugar a machos, en cambio, los del izquierdo a hembras, esta creencia se mantuvo hasta el siglo XVIII, con lo que en aquella época no era descabellado proponer la extracción quirúrgica del testículo izquierdo para evitar la descendencia femenina; en cambio, el médico griego Hipócrates pensaba que tanto el semen masculino como el femenino se mezclaban y se producía un feto del semen del sexo más fuerte.<sup>20,21</sup>

Lo cierto es que a lo largo de los años se han llevado a cabo muchas prácticas, siempre con la misma finalidad de favorecer la generación de machos o hembras; entre otras tenemos: recitar poemas durante el coito, programar las relaciones en función a las fases lunares, colgar los pantalones en un lado u otro de la cama<sup>21</sup>, la posición durante el acto sexual (norte/sur) <sup>22</sup> e incluso la ingesta de ciertas dietas.<sup>23</sup>

## **2.2. Sexo Cromosómico**

A principios de 1910 fue observado en los mamíferos los cromosomas sexuales<sup>24</sup>; para 1990, Andrew Sinclair demostró que el efecto de masculinización del cromosoma Y se debía a un gen que denominaron SRY (Región del cromosoma Y determinante del sexo, por Sex-determining region Y )<sup>2</sup>; la importancia de este gen es que proporciona la señal inicial que causa la transformación de la gónada indiferenciada en testículos, conductos genitales y caracteres sexuales masculinos, mientras que en la hembra, es la ausencia del gen SRY lo que permite el desarrollo del aparato genital femenino.<sup>25</sup>

Hoy sabemos que el sexo cromosómico del embrión está determinado por el tipo de espermatozoide que fecunde el

óvulo durante la fecundación. Por consiguiente, es el padre no la madre, quien determina el sexo del embrión.<sup>6</sup> Así, la fecundación producida por un espermatozoide con carga cromosómica X da por resultado un cigoto XX, el cual se desarrolla en una hembra, en tanto que la fecundación dada por un espermatozoide Y producirá un cigoto XY, que se desarrollará en un macho. Si bien, la proporción de sexo al momento de la fecundación (proporción de sexo primario) deberá ser de 1.00 (100 machos por cada 100 hembras) <sup>26</sup>, es bien conocido que en la especie humana nacen un mayor número de varones que de niñas en todos los países.<sup>25</sup>

Aún hoy en día existe todavía gran controversia, debido a que muchos biólogos evolucionistas sugieren que en los mamíferos la hembra puede tener un rol en la influencia del sexo de los hijos a través de cierta concentración de glucosa y testosterona, además de que una buena condición corporal, podrían ser factores que influyan en la determinación del sexo (más hembras que machos) <sup>27</sup>.

### **2.3. Aplicación del sexado de semen**

#### **2.3.1. Humanos**

La aplicación de la selección del sexo en humanos, podría eventualmente tener un propósito lucrativo, pero existen muchos cuestionamientos éticos en diversas culturas<sup>7</sup>, lo cierto es que tendría un alto potencial benéfico. Como por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedades genéticas ligadas al sexo, como la hemofilia o distrofia muscular<sup>28</sup>; o la detección temprana de desórdenes en el embrión en desarrollo. Ello permitiría la selección y transferencia de salud en la concepción desde el útero<sup>16</sup>, o simplemente para balancear la proporción familiar.<sup>29</sup>

#### **2.3.2. Animales de compañía**

La alta estima de caballos y perros puede ser un factor dominante para preferir un sexo.<sup>7</sup> Por ello es deseable lograr la eficiencia en la congelación de semen sexado para mantener una preservación de la descendencia de una mascota estimada.<sup>30</sup>

### **2.3.3. Animales de vida salvaje**

La preselección del sexo forma parte de los esquemas genéticos para disminuir la consanguinidad y para generar individuos del sexo deseado.<sup>28</sup>

Numerosas aplicaciones a través de pocos años se han logrado en varias especies en peligro de extinción, tales como la re-problación<sup>31</sup> de animales de zoológico y acuáticos.<sup>32</sup>

Recientemente, la primera preselección del sexo en crías en especies de vida salvaje fue reportada tras la inseminación de una hembra alce con semen sexado descongelado.<sup>33</sup> Aunque, la aplicación del sexado de semen en la crianza de animales de vida salvaje es limitada, debido a la problemática para la obtención del semen de los machos cuando no se tienen cerca, esto puede ser facilitado al congelar pajillas con espermatozoides y después ser descongeladas.<sup>32, 33</sup> En los primates (babuino, el mono pequeño de América del sur, chimpancés y el gorila occidental), utilizando semen congelado en pajillas, después de remover el criodiluyente se observó una alta movilidad progresiva de los espermatozoides y el acrosoma intacto.<sup>34</sup>

#### **2.3.4. Animales para Deporte**

Incluye a muchas especies como los alces, galgos, caballos y camellos. En los animales para cacería los machos son vistos como trofeos y apreciados por su belleza más que las hembras<sup>7</sup>; sin embargo estas últimas se necesitan para la producción y crianza de machos para éste fin.<sup>35</sup>

#### **2.3.5. Investigación**

En muchas áreas de investigación, la predeterminación del sexo puede reducir los costos; en parte, por medio de la disminución del número de animales requeridos en un estudio.<sup>35</sup>

#### **2.4. Ventajas del sexado de semen**

La preselección del sexo se planteó como una herramienta para acelerar los procesos genéticos, obteniendo progenie de un sexo determinado proveniente de padres con características raciales; como productivas, altamente seleccionadas.<sup>36</sup>

A nivel de campo el uso de semen sexado, a buen costo, disminuiría los partos distócicos en las hembras de

reemplazo<sup>10</sup>, así como los costos de inversión en pruebas de progenie y permitiría obtener más hembras de reemplazo<sup>37</sup>; además puede ser usado para seleccionar a los mejores ejemplares, empleando semen sexado de individuos con calidad genética probada.<sup>11</sup>

Adicionalmente, la obtención de crías del sexo deseado ofrece las ventajas de la diferencia en el valor de machos y hembras para propósitos específicos del mercado<sup>33</sup>, como carne o leche.<sup>38</sup>

En combinación con otras tecnologías disminuye el riesgo de enfermedades transmisibles y la reducción en costos de transporte en pie.<sup>39</sup>

El beneficio del semen sexado en la industria porcina, bovina y ovina, representa un gran potencial en la ganadería para producir las bases del sexado de semen.<sup>40</sup>

La utilización de Prácticas Reproductivas Asistidas (ART) para la producción de semen sexado en la ganadería, dependerá de la eficiencia económica, efectividad y facilidad en su uso.<sup>40, 41</sup> Es decir, el uso extenso de esta tecnología podría incrementarse si se consideran estos factores y si ésta es mejorada para llegar a aprovechar las demandas del mercado.<sup>40</sup>

## **2.5. Técnicas utilizadas para el sexado**

Hasta la fecha, se han producido millones de crías con sexo seleccionado en una vasta variedad de especies<sup>41</sup>, tales como conejos<sup>40</sup>, cerdos<sup>41</sup>, bovinos<sup>42</sup>, ovejas<sup>43</sup>, humanos<sup>44</sup>, caballos<sup>45</sup>, búfalos<sup>46</sup>, alces<sup>31</sup>, delfines<sup>47</sup>, perros<sup>48</sup> y gatos<sup>49</sup>, sin embargo el uso del sexado del esperma es una tecnología con varias dificultades.<sup>41</sup>

Diferentes criterios han sido utilizados para la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X o Y<sup>14</sup>, tales como tinción de quinacrina, descrita por Pearson<sup>50</sup> en 1970, basada en la fluorescencia del cuerpo F en el espermatozoide del ser humano.

Roberts<sup>51</sup> en 1940, menciona que en el caso del ser humano un cambio en el pH de la vagina puede influenciar en el sexo de los hijos.

El uso de la electroforesis para separar las poblaciones de espermatozoides del semen de conejos fue empleado en 1972 por Gordon.<sup>52</sup> Mientras que Steeno<sup>53</sup> en 1975 introduce la utilización de columnas de sephadex para la separación de las poblaciones espermáticas del bovino, logrando el enriquecimiento del 54% de espermatozoides X y del 70% de espermatozoides Y. Otro método utilizado fue el inmunológico, basado en el antígeno de histocompatibilidad

(H-Y) <sup>23</sup> que se encuentra sobre la superficie de las células del macho, pero no de la hembra.<sup>54</sup>

La velocidad de "nado" fue reportado por Ericsson en 1973, quien observó mayor movilidad en una fracción de espermatozoides de humano, los cuales fueron aislados al colocar el semen en un colchón de albumina sérica bovina (BSA), en donde los espermatozoides migraban a través del medio.<sup>55</sup>

Por su parte, la técnica de centrifugación en gradientes de densidad es basada en la diferencia de densidad que existe entre los espermatozoides X y Y<sup>23</sup>; la examinación de esta variación entre varias especies de mamíferos reveló que existe diferencia en el contenido de DNA que va de 2.5% a 4.5%<sup>24</sup>, además de que el cromosoma X es entre 2.9% y 4.2% más largo que el cromosoma Y, siendo la diferencia de densidad entre el cromosoma X y Y de 0.0007 g/cm<sup>3</sup>, lo que hace la separación teóricamente posible.<sup>16</sup>

Kaneko<sup>56</sup> en 1984, empleando gradientes de Percoll separa por diferencias en densidad, los espermatozoides Y del ser humano, validando el enriquecimiento por la presencia del cuerpo F.

Kaneko<sup>57</sup> y Mohri<sup>58</sup> logran la separación de los espermatozoides portadores del cuerpo F del ser humano al

emplear el gradiente de densidad con Percoll (con un 97% de enriquecimiento) y el uso de éstos en la inseminación. Lizuka<sup>59</sup> en 1987 consigue el enriquecimiento de espermatozoides X del ser humano, empleando también gradientes de Percoll y su uso para inseminación, en donde 6 de 15 bebés fueron hembras.

Por otro lado, Upreti<sup>60</sup> en 1988 utiliza un gradiente continuo de Percoll para la separación de las poblaciones espermáticas del semen de bovino, obteniendo dos fracciones; una de espermatozoides móviles y otra de espermatozoides no móviles con morfología anormal, logrando incrementar la primera fracción al adicionar al gradiente una solución búfer de bicarbonato (pH 7.4) y albúmina sérica bovina.

Otras técnicas utilizadas en la actualidad son, la colección y transferencia de embriones para su sexado<sup>30</sup>, fluorescencia por hibridación *in situ*<sup>6</sup> (FISH), sexado con reacción de amplificación isotermal mediada (LAMP)<sup>61</sup>, e inyección espermática intra-citoplasmática (ICSI).<sup>30</sup>

Por último, la tecnología del sexado de semen por citometría de flujo fue desarrollada en Lawrence Livermore National Laboratory por el Dr. Pinkel<sup>62</sup>, quien separó núcleos de espermatozoides X y Y de la especie *Microtus oregoni*, tomando en consideración el 9% de

diferencia en el contenido de DNA entre los cromosomas sexuales. Esta tecnología fue tiempo después implementada por USDA Beltsville Agricultural Reserch Center para su aplicación en la ganadería.<sup>63</sup>

La técnica consiste en teñir el DNA del espermatozoide con el colorante Hoechst 33342 (bisbenzimidazol fluorescente), el cual tiene la particularidad de emitir una fluorescencia azul cuando es sometido a la luz láser<sup>63</sup>, a mayor cantidad de ADN mayor fluorescencia. Para poder detectar la diferencia de fluorescencia y separar la población de 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 por un campo magnético y finalmente recolectados en un tubo para su posterior congelación.<sup>64, 65, 66, 67</sup>

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, lo que ocasiona disminución de los parámetros de fertilidad y la necesidad de contar con personal altamente capacitado.<sup>6, 7,36, 68,69</sup>

## **2.6. Características de Hoechst 33342**

Es un fluorocromo usado rutinariamente para medir la cantidad de DNA en los cromosomas X y Y en los espermatozoides de los mamíferos para que éstos pueden ser separados por citometría de flujo; el cual puede separar a las poblaciones hasta con una diferencia <3% en el contenido de DNA.<sup>70</sup>

El Hoechst 33342 es un colorante sintético fluorescente, disbenzimidazol, que contiene 2 anillos consecutivos con terminal N-metil piperazina y grupos fenólicos elongados. Esta molécula penetra la membrana de las células y se une a las bases adenina-timina en la cadena de ADN.<sup>71</sup> Es relativamente soluble al agua y considerado como un colorante poco tóxico, se excita con luz ultravioleta (UV).<sup>72</sup> Algunos tipos de células somáticas son más

sensibles al Hoechst 33342 que otro tipo de células, por lo que pueden ser afectadas por la concentración del fluorocromo usada para el sexado del semen ( $\sim 112\mu\text{M}$ ).<sup>73,74</sup>

El DNA del espermatozoide, debido a su compactación y estabilización es relativamente inerte, sin embargo las concentraciones de  $100\mu\text{M}$  Hoechst 33342 pueden causar una paralización en la movilidad espermática por lo tanto, hay que considerar que en los espermatozoides como el del humano el núcleo es más compacto que el de otras especies como el del bovino.<sup>44</sup>

Si bien el Hoechst 33342 es usado casi de manera obligatoria en el sexado de las poblaciones de espermatozoides X y Y, aparentemente porque no causa problemas detectables fenotípicamente<sup>6, 29, 38, 44, 65</sup>, lo cierto es que esta tinción decrece la viabilidad espermática pero si a pesar de eso, después del proceso de sexado, el espermatozoide mantiene sus características morfo-funcionales pudiendo ser usado satisfactoriamente en la producción o después de ser almacenado.<sup>75</sup>

## **2.7. Fundamento teórico de la Centrifugación en gradientes de densidad**

### **2.7.1. Centrifugación**

La técnica se fundamenta en la aplicación de una fuerza centrífuga que ayuda a la separación de las partículas en un medio líquido. El porcentaje de sedimentación de las partículas depende de la naturaleza de la partícula, del medio en que encuentran suspendidas, así como de la fuerza aplicada a las partículas. De este modo, la sedimentación va en relación al tamaño de la partícula y un factor importante que afecta el porcentaje de sedimentación, es la viscosidad del medio.<sup>76</sup> Es decir, las partículas más grandes sedimentan con mayor rapidez que las pequeñas de forma y densidad similar. La tendencia de las moléculas a sedimentarse durante la centrifugación se contrarresta por efectos de la difusión, que ocasiona que las moléculas se redistribuyan de modo más uniforme.<sup>77</sup>

### **2.7.2. Gradientes**

Un medio para gradientes de densidad, está formado por dos partes: un soluto y un disolvente. Los gradientes continuos son aquellos en los que la densidad antes de la centrifugación es uniforme en todo el medio y los gradientes discontinuos presentan capas de distintas

densidades, donde la de mayor densidad se encuentra en el fondo.<sup>15</sup> Los gradientes deben cumplir ciertas características como:<sup>78</sup>

- Poseer un amplio rango de densidad
- No afectar la actividad biológica de la muestra
- No ser hipo o hiper-osmóticos
- Fácil remoción a partir del producto purificado
- No ser sensible al rango de luz UV y visible
- Económico y accesible
- Que se puedan esterilizar
- No corrosivos, tóxico y flamables<sup>76</sup>

### **2.7.3. Medios de separación utilizados**

En la mayoría de los casos, el disolvente utilizado es una solución acuosa amortiguadora cercana al pH fisiológico, aunque tanto la composición como el pH dependen de la naturaleza biológica de la muestra que será fraccionada, así como del tipo de gradiente que se utilizará.<sup>79</sup>

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

- *Sacarosa*: Disacárido ampliamente empleado en la separación y purificación de muestras biológicas

mediante centrifugación zonal. Sin embargo presenta una alta viscosidad, lo que no le permite alcanzar grandes densidades. La molécula es además osmóticamente activa, por lo que no es la más adecuada para aislar células o componentes celulares. Por lo demás es barata y de fácil adquisición. Otras de sus ventajas es su carácter no iónico. Se utiliza en el estudio de proteínas.<sup>80</sup>

- *Ficoll*: Polisacárido sintético de alto peso molecular (400 kDa). Presenta un alto contenido en grupos hidroxilo por lo que tiene una buena solubilidad en medios acuosos. Además no presenta grupos ionizables que puedan servir de unión a las muestras. Es estable a pH neutro y alcalino, pudiendo ser esterilizado en autoclave sin degradarse, no altera la presión osmótica del medio. Debido a sus propiedades, el Ficoll se ha utilizado para la separación de células y partículas sub-celulares mediante centrifugación zonal.<sup>80</sup>

- *Percoll*: Es una suspensión de partículas (5.15  $\mu$ m) de ácido salicílico revestidas con un derivado de polivinilo (polivinilpirolidona, PVP) que presenta baja viscosidad a densidades altas, no afecta prácticamente a la presión osmótica del medio y es estable a pH

comprendidos entre 5 y 10. Es soluble en solución acuosa y estable en ellas siempre que no haya aniones bivalentes (sulfato), especialmente a bajos pH. El compuesto puede ser utilizado para centrifugaciones zonales, preformando gradientes, o bien para centrifugación isopícnica; sin embargo la centrifugación en Percoll, empleando rotores angulares durante 20-30 minutos y 20000-100000g, produce un ligero gradiente, independientemente de la densidad inicial del mismo.<sup>80</sup>

#### **2.7.4. Centrifugación en gradientes de densidad**

Edward Kuff fue pionero en el uso de la centrifugación en gradientes de densidad, mostrando que esta técnica puede ser usada para la determinación del peso molecular en crudo de un soluto y para el análisis de fracciones de partículas sub-celulares.<sup>78</sup>

En la década de los 50's, Myren K. Brakke, desarrolló una sedimentación zonal utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa para la separación del virus de la papa amarilla enana.<sup>78</sup> En un inicio el empleo de los gradientes de densidad fue limitado, pero su utilidad, como método de separación, creció en diferentes campos de la investigación biológica.<sup>77</sup>

En la actualidad, los investigadores emplean la centrifugación en gradientes de densidad para aislar partículas tan diversas como proteínas, virus, células o sus organelos y actualmente se siguen encontrando nuevas aplicaciones.<sup>81</sup>

Una de las mayores ventajas de la centrifugación, es que permite la separación de las células, siendo un método suave que mantiene la función de las células.<sup>82</sup>

#### **2.7.5. Separación de espermatozoides por centrifugación en gradientes de densidad**

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<sup>83, 84</sup>. 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<sup>55</sup>; mientras que Rhode separó las fracciones ricas en espermatozoides X y Y usando la ultra-centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa.<sup>57</sup>

En 1977 Hedge<sup>85</sup> reporta la separación de espermatozoides X y Y de humano, por medio de centrifugación en gradientes

de densidad utilizando Ficoll al 8% y 33% de metrizoato de sodio, obteniendo el enriquecimiento de 62.9% y 45.2% de espermatozoides X y Y, respectivamente. Mientras que Shartry obtiene una fracción con alta proporción de espermatozoides X (hasta un 80.6%), mientras que para los espermatozoides Y el 76%<sup>86</sup>. En 2003, Hossepian y colaboradores<sup>87</sup> utilizando centrifugación en gradientes de densidad con Percoll reportaron la separación espermatozoides de bovino portadores del cromosoma X, con una pureza de 81%, y manteniendo una viabilidad comparada a la de espermatozoides no sexados.

En 2009 Vázquez utiliza la centrifugación en gradientes de densidad utilizando Ficoll-diatrizoato de sodio, utilizando semen de bovino, reportó el 80% de enriquecimiento de espermatozoides X, validado por PCR-tr.<sup>15</sup>

En 2010, López<sup>88</sup> utilizando la técnica de Vázquez pero usando semen de ovino, basándose en el sexo de las crías, obtiene un 50% de machos y 50% de hembras, reportando que la técnica de centrifugación en gradientes de densidad Ficoll-diatrizoato de sodio no permitió enriquecer las poblaciones de espermatozoides, contrario a lo que reportó Vázquez<sup>15</sup> con espermatozoides de bovino.

Por otro lado, Chávez en 2011 reporta en su estudio de evaluación de la viabilidad en los espermatozoides de bovino, después del proceso de sexado, mediante gradientes de Ficoll-diatrizoato, y posteriormente al descongelado de los mismos, que un alto porcentaje se mantienen vivos (80.5% y 72.71%, respectivamente), concluyendo que este método permite obtener porcentajes de viabilidad aceptables para la posible aplicación del semen descongelado en la inseminación artificial.<sup>89</sup>

Desafortunadamente, 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.<sup>15, 68, 83, 86</sup>

#### **2.7.6. Utilización de Ficoll y diatrizoato de sodio como gradiente de densidad**

El Ficoll 400 es un polímero sintético de sacarosa y epiclorhidrina, cuyo peso molecular es de 400,000 Daltons, siendo un compuesto soluble en agua; el diatrizoato de sodio es un compuesto que se combina con el Ficoll, formando soluciones de baja viscosidad y alta densidad. La función del diatrizoato de sodio es proveer

la densidad óptima para la separación y a la vez la osmolaridad adecuada para mantener la viabilidad de las células. La mezcla de Ficoll-diatrizoato de sodio (12 partes de Ficoll al 14% y 5 partes de diatrizoato de sodio al 32.8%) contiene una osmolaridad 280 a 308 mOsm y una densidad final a  $1,077 \pm 0,001$  g/ml, siendo utilizado principalmente para la separación de componentes sanguíneos.<sup>90</sup>

Con el empleo de este tipo de gradiente de densidad, la cantidad de células a procesar debe guardar proporción con el volumen y la altura del medio de separación; el aumentar la altura del estrato celular, con respecto a la altura del medio, aumentará la contaminación en la interfase. Por esto, el diámetro del tubo es un factor importante para establecer el volumen óptimo para fraccionar. Para aumentar el tamaño de la muestra, es preferible aumentar el diámetro del tubo, tratando con ello de no variar la altura de las capas de medio y de las células.<sup>90</sup>

## **2.8. Inseminación Artificial (IA)**

La primera inseminación con éxito en mamíferos fue llevada a cabo por el Dr. Italiano Lázaro Spallanzani, en 1784 en perros.<sup>19</sup>

La IA es una técnica cuya virtud fundamental es incrementar notablemente el uso de un reproductor<sup>91</sup> y, aplicada con otras tecnologías, se convierte en una herramienta útil para hacer más eficientes los procesos reproductivos de las diversas especies domésticas de interés productivo, como bovinos, ovinos y porcinos.<sup>30</sup>

Además la IA es una de las técnicas utilizadas para evaluar el grado de separación de las dos poblaciones de espermatozoides, es decir para la evaluación de la relación de sexos de las crías nacidas de las hembras inseminadas con las fracciones ricas en espermatozoides X o Y, aunque esta es la última opción para realizar la validación del sexado del semen.<sup>92</sup>

En el caso del semen sexado por citometría de flujo, en la mayoría de los reportes se menciona la obtención de una baja fertilidad después de la IA.<sup>93</sup>

## **2.9. Aplicación del sexado en la Industria Ovina**

La demanda de proteína animal se ve incrementada dependiendo del nivel económico y preferencia en una

población<sup>92</sup>, de esta manera, la necesidad en México, obliga al MVZ a producir más alimento de una forma más eficiente.<sup>94</sup> Por tal motivo los objetivos de la producción ganadera se ven sometidos a una rápida evolución, por lo cual necesita de progreso continuos en todas las disciplinas, una de ellas, es la reproducción animal.<sup>95</sup>

Los ovinos son una fuente importante de proteína de origen animal que poseen numerosas ventajas lo que los sitúa en un lugar preponderante en la producción pecuaria.<sup>96</sup>

La selección de espermatozoides para la preselección del sexo es considerado uno de los mayores avances en la biotecnología de la reproducción. Actualmente sólo en los bovinos las crías de sexo conocido son obtenidas a nivel comercial usando la tecnología del sexado (citado por Vázquez).<sup>11</sup>

Debido a las diferencias anatómicas y fisiológicas, reproductivas entre cada especie, una de las limitaciones de la comercialización de semen sexado se ha asociado a la vida media viable del espermatozoide en el tracto genital de la hembra.<sup>30</sup> En la especie ovina, el alto nivel de alteraciones en las proteínas de la membrana espermática, producto del sexado del semen, tienen poca interferencia para el transporte del espermatozoide del

cuerpo uterino al oviducto, obteniendo un buen nivel de fertilidad.<sup>97</sup> Sin embargo, en especies como los cerdos y caballos los cambios en las proteínas pueden cambiar la forma de interacción del espermatozoide con el ambiente del útero.<sup>39</sup>

Por otra parte el mejoramiento de esta tecnología y el entendimiento de su gran impacto biológico han facilitado los avances en el sexado de espermatozoides por citometría de flujo en la oveja, mostrando que el sexado de semen es capaz de obtener una población de espermatozoides funcionalmente superior, en términos de funciones *in vitro* o *in vivo*.<sup>39</sup>

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Hasta el momento, el uso del citómetro de flujo para el sexado de espermatozoides ha demostrado ser la única opción eficiente para tal fin, pero debido a su elevado costo se busca encontrar una metodología óptima que pueda ser accesible y de bajo costo para ser empleada en grades escalas para uso comercial.

Una reciente investigación, señala que la separación de espermatozoides de bovino por centrifugación en gradientes de Ficoll-diatrizoato de sodio, ofrece resultados favorables para el enriquecimiento de la población de espermatozoides con cromosoma X.

El presente trabajo pretende aplicar la técnica de centrifugación en colchones de Ficoll-diatrizoato de sodio para obtener un enriquecimiento de la población de espermatozoides X utilizando semen de ovino y validar la técnica por citometría de Flujo e Inseminación Artificial.

#### **4. HIPÓTESIS**

El enriquecimiento de la población de espermatozoides X del semen de carnero, por la técnica de centrifugación en Ficoll-diatrizoato de sodio, permitirá obtener un mayor número de crías hembras en ovejas inseminadas artificialmente.

#### **5. OBJETIVOS**

- Obtener el enriquecimiento de la población de espermatozoides X de ovinos por medio de la técnica de centrifugación en Ficoll-diatrizoato de sodio.
- Determinar la fertilidad y la prolificidad de las hembras con estro sincronizado e inseminadas cervicalmente con una dosis de semen fresco sexado y no sexado.
- Comparar la proporción de crías hembras y machos en las ovejas inseminadas con el semen sexado y no sexado a una concentración de  $120 \times 10^6$ .
- Evaluar el enriquecimiento de la población obtenida, después del sexado del semen en colchones de Ficoll-diatrizoato de sodio por citometría de flujo.

## **6. MATERIAL Y MÉTODO**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO), ubicado en el km 53.1 de la carretera federal México-Cuernavaca en el municipio de Huitzilac, Morelos y en el Departamento de morfología, ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se utilizaron 14 borregas adultas de raza suffolk, con al menos un parto de entre tres y cinco años de edad y; 10 borregas de la raza hampshire con edad promedio de 1 año. Las hembras fueron divididas en dos grupos: 10 de las borregas de la raza suffolk fueron inseminadas cervicalmente con semen fresco no sexado a una dosis de  $120 \times 10^6$  espermatozoides (grupo 1); las cuatro restantes de la misma raza y las borregas de raza hampshire fueron inseminadas cervicalmente con semen fresco sexado también a una dosis de  $120 \times 10^6$  (grupo 2).

Los procesos que se mencionan a continuación se realizaron en CEIEPO.

### **6.1. Sincronización de borregas**

El grupo 1 (n=10) y el grupo 2 (n= 14), fueron sincronizadas a principios del mes agosto de 2010, habiendo un día de diferencia entre cada grupo, para tal efecto se colocaron esponjas vaginales impregnadas con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA), (Chrono Gest® Intervet), con ayuda de un espéculo (figura 1); para reducir el mal olor y acumulo de secreciones vaginales antes de colocar las esponjas se les adicionó un ungüento (Bovoflavina® Intervet).

A los 12 días después de colocadas las esponjas fueron retiradas y se les aplicó a las hembras 100 UI Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) intramuscular (Folligon® Intervet).

A los días 13 y 14 se detectaron las hembras en celo, esto por la mañana y por la tarde y con ayuda de un macho celador al que le fue colocado un mandil para cubrir el pene.



**Figura 1.** Material utilizado para colocar las esponjas vaginales (A, B, C: aplicadores para esponjas, D: esponja vaginal).

## **6.2. Toma de las muestras de semen**

Se utilizó el semen de 2 carneros de raza suffolk y 1 de raza hampshire de fertilidad probada; el semen fue colectado por medio de una vagina artificial, previamente se realizó la limpieza del pene y del prepucio.

Uno de los sementales de raza suffolk se utilizó para inseminar a las hembras del grupo 1 (semen fresco no sexado) y el otro semental de la misma raza se utilizó para inseminar a las hembras de la misma raza pertenecientes al grupo 2 (semen fresco sexado), mientras

que el resto de las hembras de este último grupo fueron inseminadas con el semental de raza hampshire.

Para la inseminación con semen fresco sexado se obtuvieron 2 eyaculados de cada macho (suffolk y hampshire), mientras que para la inseminación con semen fresco no sexado sólo se necesitó de un eyaculado.

### **6.3. Preparación de las dosis de semen fresco no sexado**

Una vez obtenido el eyaculado se puso en baño maría a 37°C. Se tomó una gota de semen, se colocó en una laminilla y se observó al microscopio para determinar la movilidad en masa de los espermatozoides; también se evaluó el volumen y color. La concentración espermática fue determinada por medio de la cámara de Neubauer.

Una vez determinada la concentración de espermatozoides por ml se estimó el número de dosis a obtener de cada eyaculado, para ello se dividió la concentración de los espermatozoides móviles entre el número de espermatozoides a inseminar (concentración por dosis). El volumen final, constituido por el diluyente más el semen eyaculado, se obtuvo al multiplicar el número de dosis por el volumen de cada dosis (0.25 ml).<sup>98</sup>

$$\text{No. de dosis} = \frac{\text{Concentración de espermatozoides móviles}}{\text{Concentración dosis a inseminar}}$$

*Volumen final* = número de dosis X volumen de cada dosis

*Cantidad de diluyente a agregar* = volumen final - volumen eyaculado

Como diluyente de los espermatozoides para la inseminación se utilizó 40 ml del diluyente comercial (Triladyl®, minitüb), 40 ml de yema de huevo y 120 ml de agua tri-destilada.

#### **6.4. Transporte de semen**

Una vez colectado el semen de los carneros, para el sexado de los espermatozoides, se les adicionó una solución conteniendo (Hidroximetil aminometano), (Trizma base 300 mM, fructuosa 27.8 mM, ácido cítrico 27.8 mM), pH 7.4, a una dilución de 1:1 y se colocó en baño maría a 37°C en un termo para ser transportado al Departamento de morfología de FMVZ-UNAM.

Los siguientes procedimientos se realizaron en el Departamento de morfología.

### **6.5. Centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio**

Como ya fue mencionado, las muestras fueron transportadas al laboratorio del Departamento de morfología en tubos falcones graduados, al llegar fueron traspasadas a tubos de ensaye de vidrio de 15 ml y se cubrieron con papel aluminio para conservar el calor y evitar cambios bruscos de temperatura.

Una gota del semen de los eyaculados fue colocada en un portaobjetos (previamente precalentado en una termoplatina a 32°C) y se observó la movilidad.

Para el gradiente de densidad el Ficoll (PM 400 Sigma-Aldrich) se preparó al 8% en Solución Buffer de fosfato (PBS) y el diatrizoato de sodio (Sigma-Aldrich) al 32.8% también en PBS.

La muestra de semen se centrifuga a 2500 rpm durante 5 min, para eliminar el plasma seminal y la solución que le fue adicionada para su transporte. Una vez centrifugado se resuspendió el semen en PBS.

Para determinar la concentración espermática 500 µl de solución Tritón al 1% y 25 µl de semen fueron resuspendidos en un tubo Eppendorf, se homogenizaron y se

colocan 20  $\mu$ l de la suspensión espermática en una cámara de Neubauer, y la concentración espermática fue ajustada a  $160 \times 10^6$ /ml con PBS.

Un total de 48 gradientes fueron preparados; en donde cada gradiente fue preparado con 2.4 ml de Ficoll-PBS al 8% más 1 ml de diatrizoato de sodio-PBS al 32.8%<sup>15</sup> colocados en tubos de ensaye de vidrio de 10 ml y mezclados, delicadamente sobre el colchón se colocó la muestra espermática a una concentración de  $160 \times 10^6$  células/ml. Las muestras fueron centrifugadas a 750 rpm durante 15 minutos. Después de la centrifugación se observaron tres interfases, así como una pastilla en el fondo del tubo, las pastillas fueron recuperadas mediante aspiración con una pipeta Pasteur y colocadas en un tubo de ensaye de vidrio de 10 ml, re-suspendidas en PBS y centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos y se procesaron para ser empajilladas.

#### **6.6. Viabilidad espermática por tinción vital eosina-nigrosina**

Para determinar la viabilidad de los espermatozoides antes y después del sexado se utilizó la técnica de

eosina-nigrosina (E-N), descrita por Dott y Foster<sup>99</sup> en 1972.

Esta evaluación sólo se realizó para el semen de uno de los macho suffolk utilizado para las hembras del grupo 2.

En un tubo Eppendorf se colocó 200 µl de eosina-nigrosina (eosina 0.167 gr, nigrosina 1 gr, citrato de sodio 0.29 gr, agua destilada cbp 10 ml), dejando atemperar a 37°C por 5 minutos, después se toman 10 µl de la muestra de semen y se le adicionó 80 µl de eosina-nigrosina para obtener una dilución de 1:8 y se dejó incubar durante 5 minutos. Trascurriendo este tiempo se elaboraron frotis en portaobjetos atemperados a 37°C, se dejaron secar al aire y se montaron con resina y cubreobjetos para el conteo posterior de 200 células al microscopio de luz, diferenciando entre vivos (no teñidos) y muertos (total o parcialmente teñidos).<sup>100</sup>

#### **6.7. Elaboración de las pajillas de semen sexado**

Una vez recuperando las pastillas del semen centrifugado para su sexado en gradiente de densidad Ficoll-diatrizoato de sodio, se tomó una gota del semen

colectado, se colocó en un portaobjetos y se observó al microscopio para determinar la movilidad progresiva.

Para determinar la concentración espermática se tomaron 25 µl de semen y 500 µl de tritón al 1% en PBS, se colocaron en un tubo Eppendorf, se homogenizaron y una gota fue colocada en una cámara de Neubauer. La concentración se ajustó utilizando el diluyente comercial (Triladyl® minitüb) para obtener una concentración de  $120 \times 10^6$  para pajillas de 0.25ml.

#### **6.8. Transporte de semen al CEIEPO**

Una vez sexado el semen se colocó en un tubo de ensayo de 10 ml, se selló con papel parafina (Parafilm®, laboratory film), se envolvió en papel aluminio y se le colocó en un termo a una temperatura 32°C aproximadamente.

#### **6.9. Inseminación cervical de las borregas**

La inseminación artificial se llevó a cabo entre 10 y 12 hrs después de haber sido detectadas las hembras en celo; en el caso del semen sexado transcurrieron aproximadamente 7 hrs de haber sido colectado el semen.

Para la inseminación las borregas fueron colocadas sobre un potro, de tal manera que se facilitara la visión para el inseminador y de mantener lo más cómodo posible al animal.

Una vez colocadas las hembras sobre el potro se introdujo un vaginoscopio, previamente lubricado con un producto para uso humano KY®, hasta localizar el cérvix, introduciéndose entonces el aplicador de pajillas y se depositó el semen delicadamente en la entrada del cérvix (os externa).<sup>101</sup>

#### **6.10. Diagnóstico de gestación**

Este se realizó entre los días 30 y 35 posterior a la inseminación artificial, para confirmar el diagnóstico de gestación se utilizó un ultrasonido de imagen con transductor de 3.5 MHz.

#### **6.11. Análisis estadístico**

Fue evaluado el porcentaje de fertilidad empleando una chi-cuadrada, la prolificidad utilizando T Student y la proporción de las crías hembras y machos por medio de una prueba exacta de Fisher.

La viabilidad espermática a través de la tinción eosina-nigrosina fue evaluada con T Student.

#### **6.11.1. Validación de la técnica de centrifugación en colchones de Ficoll-diatrizoato de sodio por citometría de flujo**

Para este ensayo los animales empleados fueron diferentes a los utilizados para la inseminación artificial. Cabe mencionar que este objetivo fue planteado poco después de haber inseminado el semen sexado y gracias a que se presento la oportunidad de emplear esta metodología para evaluar nuestro procedimiento de sexado.

La valoración de la técnica se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda, Siglo XXI, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social.

El citómetro de flujo utilizado es de la marca BD Facsria<sup>TM</sup>, el cual cuenta con un sistema estable de alta alineación para seleccionar y separar células, este aparato puede operar hasta 70,000 eventos por segundo, con capacidad de analizar 13 marcadores.

#### **6.11.1.1. Obtención de la muestra**

Los eyaculados fueron obtenidos de dos carneros de fertilidad probada, con ayuda de una vagina artificial. Los animales pertenecen al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO). De los cuales se obtuvieron 2 eyaculados de cada uno.

#### **6.11.1.2. Transporte de la muestra**

Para el transporte de los eyaculados al Departamento de morfología estos fueron adicionados con una solución conteniendo Trizma base (Hidroximetil aminometano) 300 mM, fructuosa 27.8 mM, ácido cítrico 27.8 mM, pH de 7.4, a una dilución 1:9, se colocaron en baño María a 37°C en un termo.

#### **6.11.1.3. Preparación de la solución stock de Hoechst**

##### **33342**

Para la preparación de la solución stock se utilizaron 4 mg de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) los cuales fueron disueltos en 1 ml de PBS, de esta solución inicial se tomaron 1.35  $\mu$ l y se mezclaron con 874.64  $\mu$ l de PBS en un

tubo Eppendorf, de esta manera se obtuvo la solución stock a una concentración de 8.9 mM descrita por Schenk.<sup>33</sup>

Alícuotas de 25  $\mu$ l de la solución stock fueron hechas para ser empleadas posteriormente en la solución de trabajo (224  $\mu$ M), siendo envueltas con papel aluminio, y se colocaron en una caja protegida de la luz para su congelación a 4°C.

Todo este procedimiento se realizó en la oscuridad con la ayuda de una lámpara de luz neón.

#### **6.11.1.4. Tinción vital de eosina-nigrosina**

Para evaluar la viabilidad de los espermatozoides antes y después del sexado se realizó la tinción de eosina-nigrosina, previamente descrita, a los 4 eyaculados utilizados.

#### **6.11.1.5. Ajuste de la concentración del semen**

El semen sexado por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio fue procesado como se indicó, para la evaluación de su concentración las células recuperadas fueron re-suspendidas a la concentración a  $15 \times 10^6$ /ml en PBS y coloca en tubos con

rosca para cultivo. Como control se utilizó el semen no sexado.

#### **6.11.1.6. Tinción Hoechst 33342**

Las alícuotas congeladas del fluorocromo antes de su uso fueron previamente descongeladas a temperatura ambiente en un cuarto oscuro.

Se adicionó una alícuota de trabajo de Hoechst 33342 a los tubos con semen sexado, (1 ml a una concentración de  $15 \times 10^6$  células) se homogeniza e incuban a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, de igual manera los tubos control (sin fluorocromo).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron colocadas en un termo con un refrigerante a  $35^{\circ}\text{C}$  y transportados al Hospital Siglo XXI para su evaluación en el citómetro de flujo.

Todo este manejo se realizó en un cuarto oscuro con ayuda de una lámpara de luz neón.

#### **6.11.1.7. Citómetro de flujo BD Facsria™**

Este equipo consta de un láser Argón, utilizándose una exposición de 359nM, con un pico máximo de emisión de 461 nM, donde se seleccionó a los eventos que corresponden a células y se capturaron 10000 eventos para tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A).

La intensidad de la fluorescencia de los espermatozoides fue analizada después de una selección primaria basada en el tamaño (FSC-A) y la complejidad celular o granularidad (SSC-A), esto con la finalidad de excluir partículas contaminantes como aglutinaciones. Utilizando el programa Summit Flowjo, win MD.

## 7. RESULTADOS

En el cuadro 1, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación en los eyaculados de los machos antes del sexado.

**Cuadro 1.** Resultados obtenidos de la evaluación en el semen de los machos.

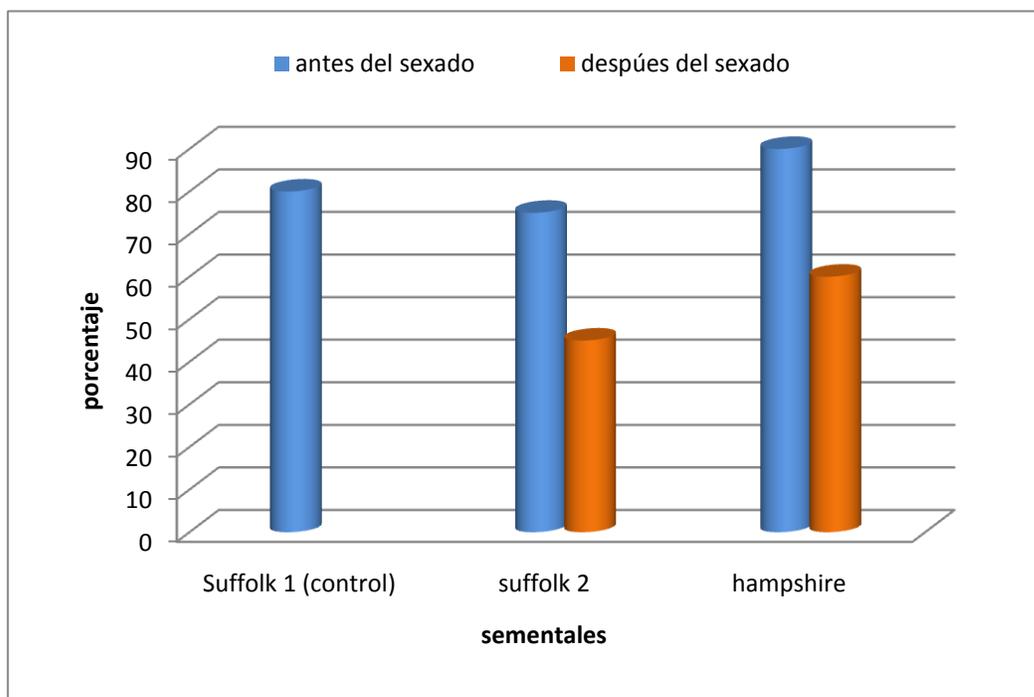
	♂ <b>suffolk</b>	♂ <b>suffolk</b>	♂ <b>hampshire</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	
<b>No. de eyaculados</b>	2	1	2
<b>Volumen</b>	3.5 ml	2 ml	4 ml
<b>Movilidad progresiva</b>	80%	75%	90%
<b>Concentración espermática</b>	302 x 10 <sup>6</sup>	418 x 10 <sup>6</sup>	380 x 10 <sup>6</sup>

En el cuadro 2 se presenta la evaluación de la movilidad del semen sexado al ser re-suspendido en el diluyente comercial (Triladyl®, minitüb) y la concentración espermática obtenida por cada 160 x 10<sup>6</sup> células sexadas. La movilidad de los espermatozoides recuperados fue de 45% en el macho de la raza suffolk, y un 60% en el macho de raza hampshire (60%).

**Cuadro 2** . Resultados de la evaluación de la movilidad espermática después del sexado

	♂ <b>suffolk 2</b>	♂ <b>hampshire</b>
<b>Movilidad progresiva</b>	45%	60%
<b>Concentración espermática de pastilla</b>	68 x 10 <sup>6</sup>	87 x 10 <sup>6</sup>

En la Gráfica 1, se observa el porcentaje de movilidad espermática antes y después del sexado para sementales utilizados en la IA.



**Gráfica 1.** Porcentaje de movilidad espermática (antes y después del sexado para sementales utilizados para la inseminación artificial)

En el cuadro 3, se muestran los porcentajes de la evaluación de espermatozoides vivos y muertos con la tinción eosina-nigrosina para los eyaculados utilizados para la Inseminación Artificial. En la figura 2 se presentan los patrones de tinción evaluados en las células, con esta técnica.

**Cuadro 3.** Evaluación de espermatozoides vivos y muertos con tinción eosina-nigrosina en eyaculados utilizados para la inseminación artificial

	Vivos	Muertos
<b>Espermatozoides antes del sexado</b>	64.67 <sup>a</sup>	35.83 <sup>a</sup>
<b>Espermatozoides después del sexado</b>	56.25 <sup>b</sup>	44 <sup>b</sup>

a y b no muestran una diferencia significativa (P>0.05)



**Figura 2.** Espermatozoide ovino vivo (A) y un espermatozoide muerto (B) teñido con eosina-nigrosina.

El Porcentaje de fertilidad de hembras Inseminadas con semen sexado y no sexado, se puede ver en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Porcentaje de gestación en hembras inseminadas con semen sexado y no sexado.

	No. de ♀ inseminadas	No. de ♀ Gestantes	% de ♀ gestantes
<b>Semen no sexado (grupo 1)</b>	10	6	60 % <sup>a</sup>
<b>Semen sexado (grupo 2)</b>	14	7	50 % <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valores no significativamente diferentes (P>0.05)

Se presenta en el cuadro 5 el porcentaje de prolificidad de las ovejas del grupo inseminado con semen no sexado (grupo 1) y no sexado (grupo 2), así como el número de crías paridas; no habiendo diferencia significativa entre grupos.

**Cuadro 5.** Porcentaje de prolificidad en ovejas, número y sexo de las crías inseminadas con semen sexado y no sexado.

	No. de crías	No. de ♀ paridas	prolificidad
<b>Semen sexado (grupo 1)</b>	8	6	114.28 <sup>b</sup>
<b>Semen no sexado (grupo 2)</b>	10	7	166.66 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> Valores significativos ( P=0.057)

En el cuadro 6, se muestra la proporción del sexo de las crías de borregas inseminadas con semen sexado y semen no

sexado. Aunque no se encontró una diferencia estadística significativa entre grupos, se pudo observar un mayor número de hembras nacidas en el grupo 2.

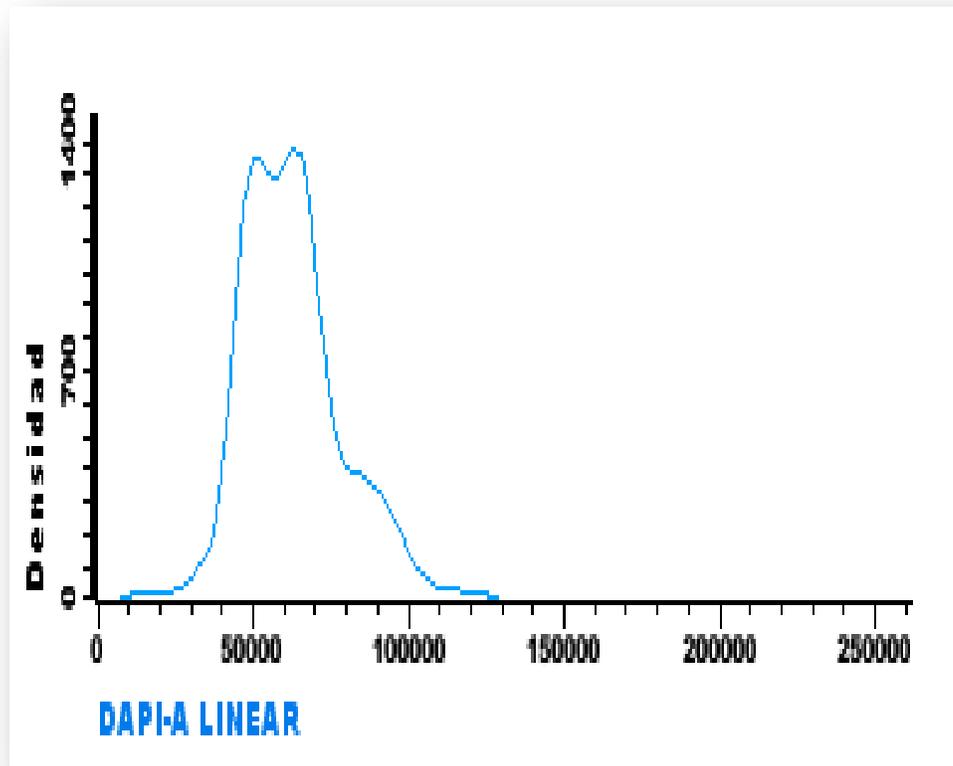
**Cuadro 6.** Proporción del sexo de las crías

	<b>Sexo de las crías</b>	
	Hembras	machos
<b>Semen sexado (grupo 1)</b>	5	3 <sup>c</sup>
<b>Semen no sexado (grupo 2)</b>	5	5 <sup>c</sup>

<sup>c</sup> Valores no significativos (P>0.05)

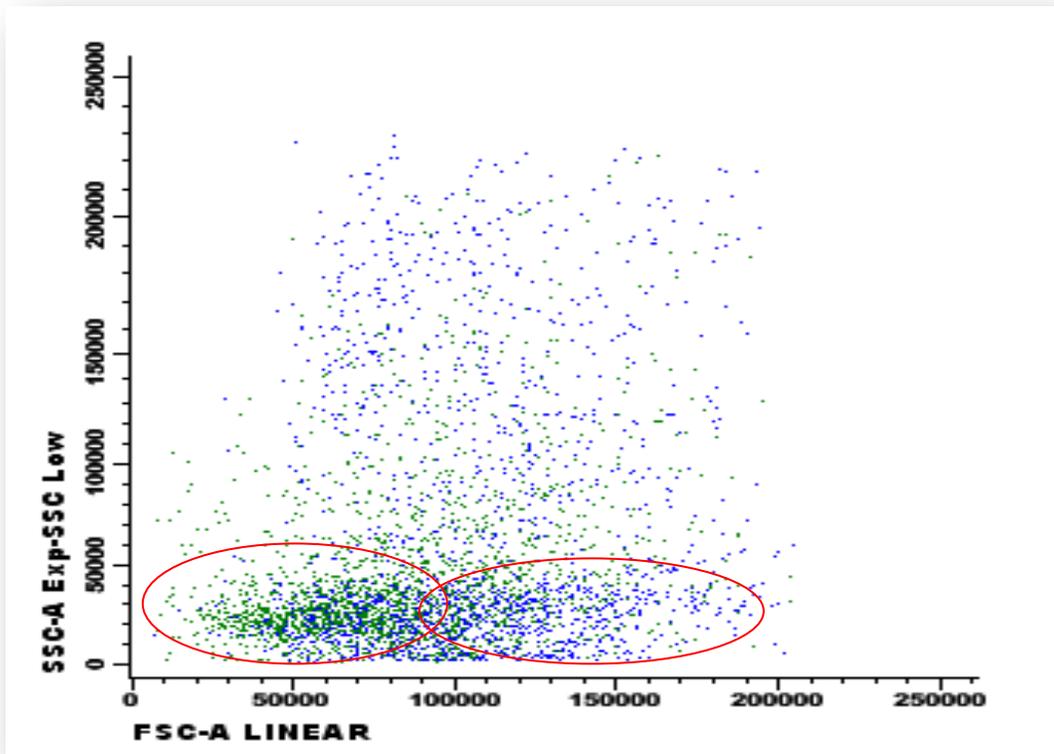
### 7.1. Análisis en citómetro de flujo

En la gráfica 2 se muestra la autofluorescencia de las células espermáticas al ser valoradas por citometría de flujo.



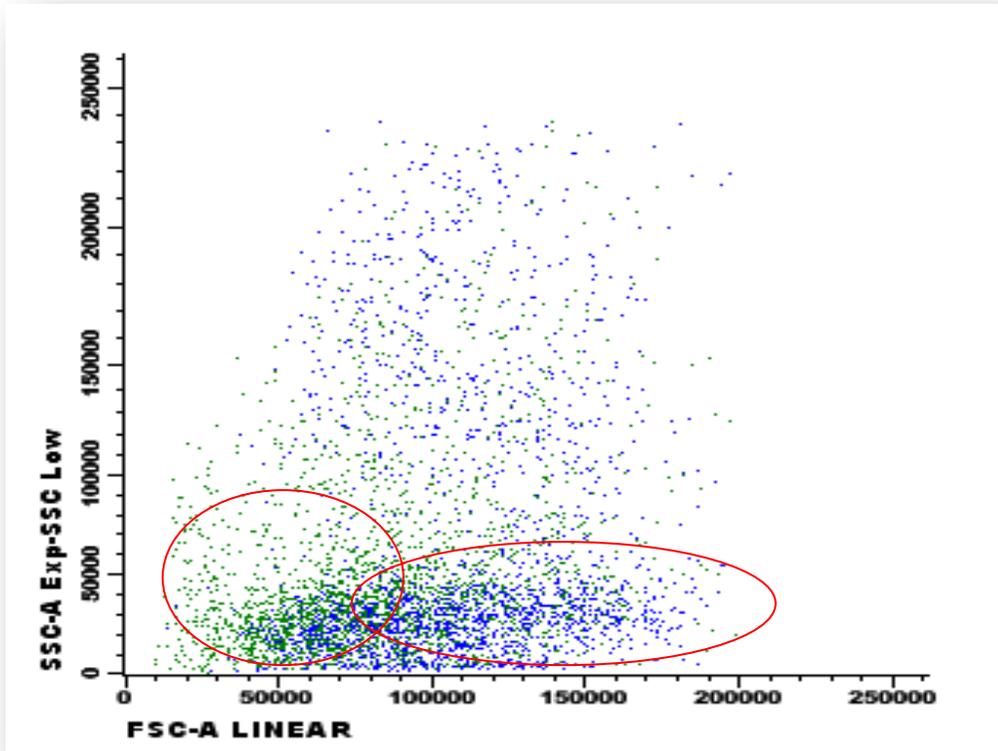
**Gráfica 2.** Se muestra las dos poblaciones de espermatozoides de un eyaculado mostrando su autofluorescencia.

La dispersión de las dos poblaciones espermáticas teñidas con Hoechst 33342 tomando en consideración su granularidad y tamaño se presenta en la gráfica 3.

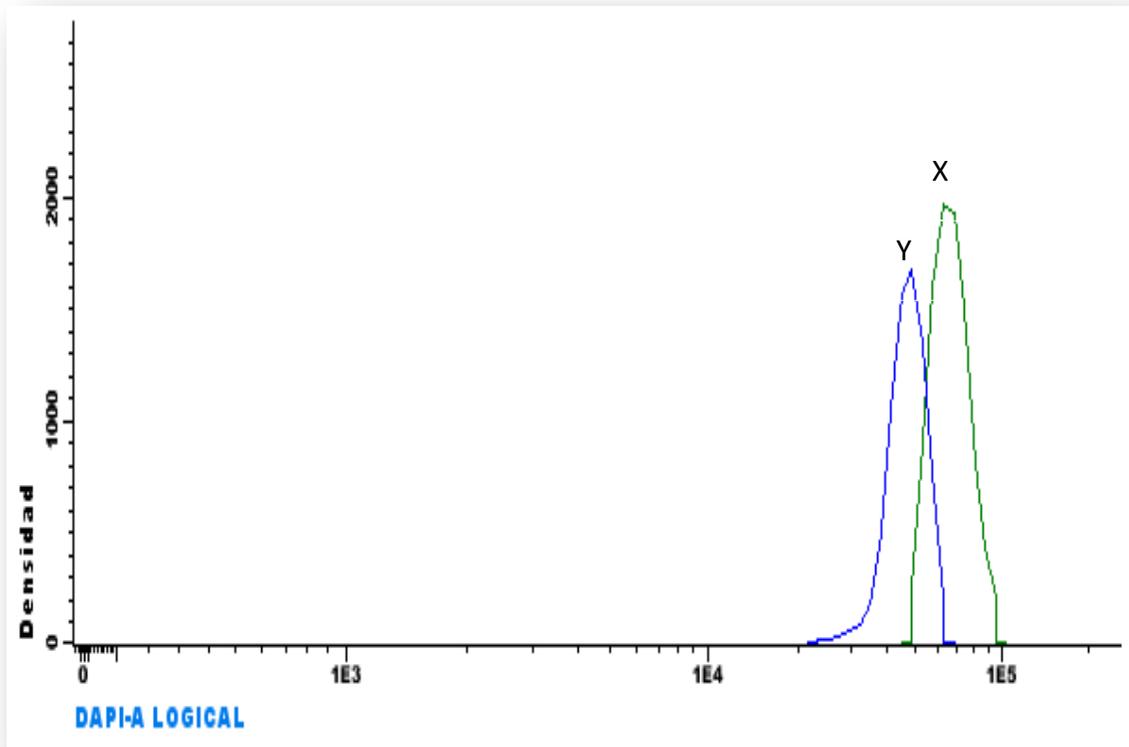


**Gráfica 3.** Gráfica de dispersión donde se observan las dos poblaciones de un eyaculado, teñidos con Hoechst 33342, utilizando los parámetros de granularidad (eje Y) y tamaño (eje X).

Se observa en la grafica 4 y 5 que la población de espermatozoides X se encuentra favorecida, en una muestra con semen sexado por la técnica de centrifugación en colchones de Ficoll-diatrizoato de sodio.



**Gráfica 4.** En la gráfica de dispersión se observan aún dos poblaciones de espermatozoides después de utilizar la técnica de centrifugación en gradientes de Ficoll-diatrizoato de sodio pero mostrándose favorecida la población X un 68% más que la población Y.



**Gráfica 5.** La población de espermatozoides X se encuentra enriquecida en el semen sexado por la técnica de centrifugación en Ficoll-diatrizoato de sodio.

La citometría de flujo mostró que existe un enriquecimiento del 68% de la población de espermatozoides X después de la centrifugación del semen en el gradiente de Ficoll-diatrizoato de sodio (gráfica 4 y 5); lo cual coincide con el número de hembras nacidas en las borregas del grupo 2.

En el cuadro 7 y en la gráfica 6 se muestra el porcentaje de viabilidad (tinción eosina-nigrosina) de los

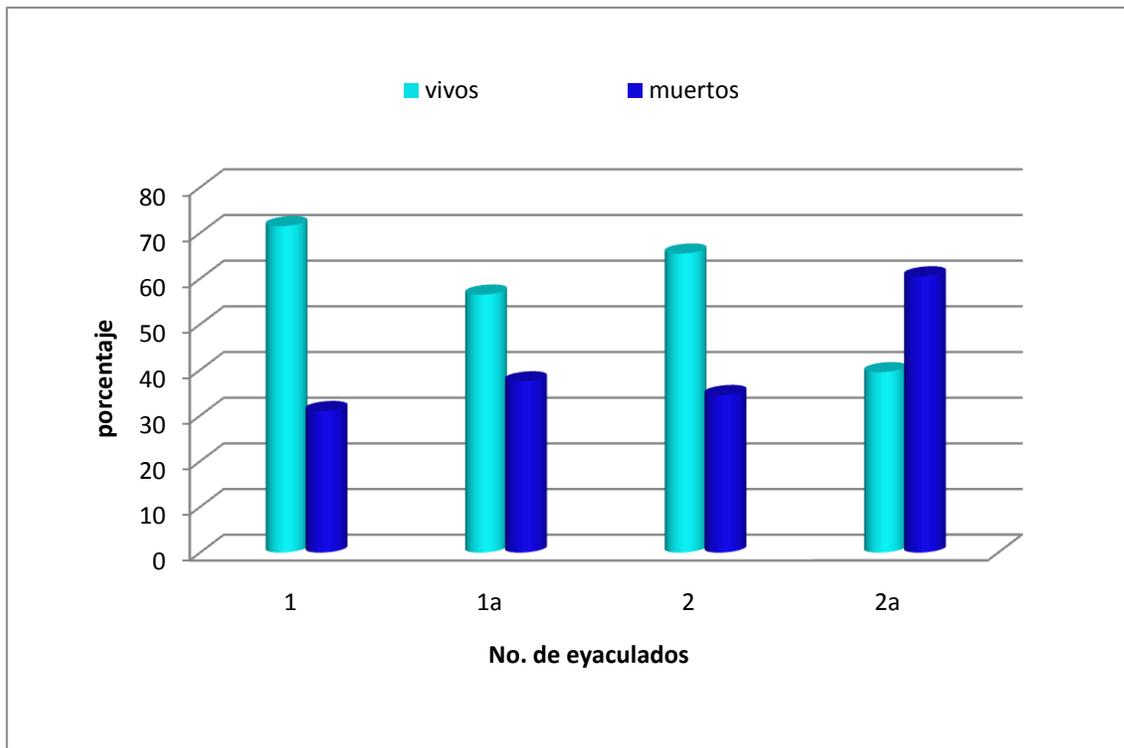
eyaculados utilizados para evaluar la técnica de centrifugación en gradientes de Ficoll-diatrizoato de sodio por citometría de flujo. Se encontró diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre el número de espermatozoides vivos antes y después del sexado (63.48% contra 56%).

**Cuadro 7.** Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos utilizando la tinción eosina-nigrosina para muestras utilizadas en citómetro de flujo.

No. de eyaculados	Antes del sexado		Después del sexado	
	% vivos	% muertos	% vivos	% muertos
<b>1</b>	71.5	31	67	33
<b>1a</b>	56.5	37.5	57.75	39.5
<b>2</b>	65.5	34.5	58.25	40.25
<b>2a</b>	39.5	60.5	46	55.5
<b>Promedio</b>	63.48 <sup>a</sup>	35.37 <sup>a</sup>	56 <sup>b</sup>	44.05 <sup>b</sup>

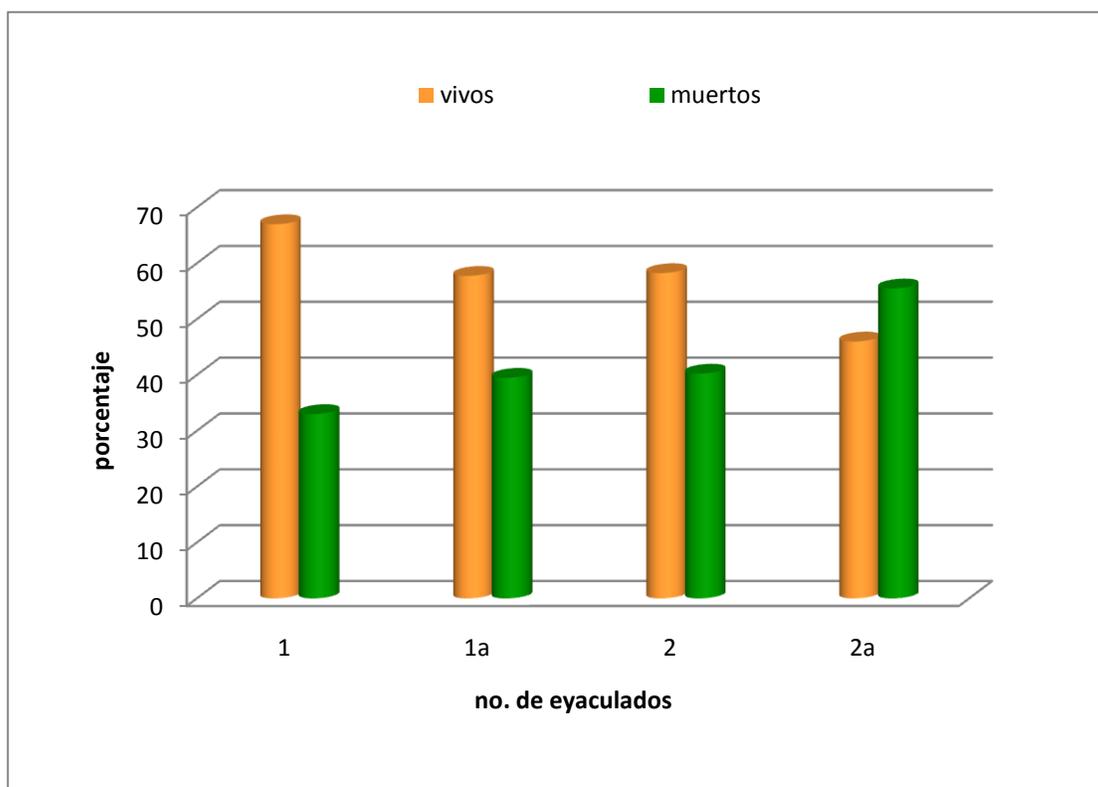
**a y b muestran una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ )**

En la Gráfica 6 se presenta el porcentaje de viabilidad espermática (células vivas y muertas), evaluada por la tinción eosina-nigrosina, antes de someter a la centrifugación en Ficoll-diatrizoato de sodio a los eyaculados.



**Gráfica 6.** Porcentaje de viabilidad espermática antes del sexado utilizando la tinción eosina-nigrosina

En la Gráfica 7 se presenta el porcentaje de la viabilidad espermática (células vivas y muertas), evaluada por la tinción eosina-nigrosina, después de someter a la centrifugación en Ficoll-diatrizoato de sodio a los eyaculados.



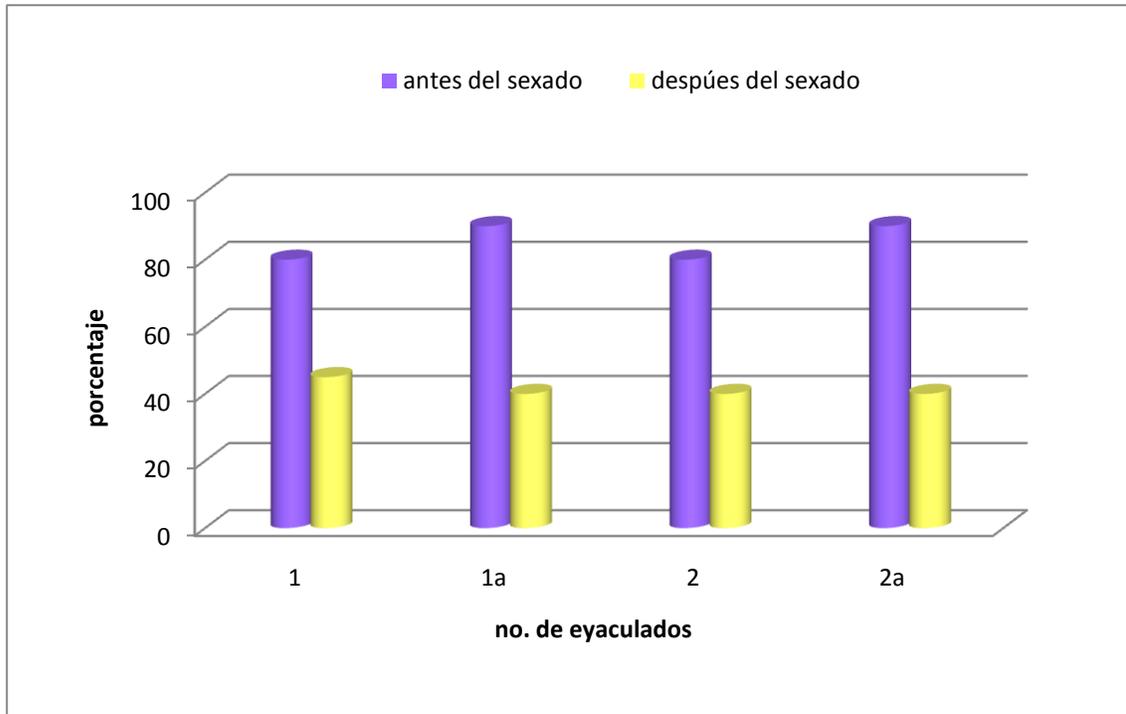
**Gráfica 7.** Porcentaje de viabilidad espermática después del sexado utilizando la tinción eosina-nigrosina

En el cuadro 8 y gráfica 8 se presenta la movilidad espermática antes y después del sexado en las muestras utilizadas para la validación del sexado por el citómetro de flujo. Las muestras después de la centrifugación disminuyeron casi a la mitad su motilidad ( $P=0<0.05$ ).

**Cuadro 8.** Movilidad espermática antes y después del sexado para muestras utilizadas en el citómetro de flujo.

<b>Eyaculado</b>	<b>% movilidad antes del sexado</b>	<b>% movilidad después del sexado</b>
<b>Eyaculado 1</b>	80	45
<b>Eyaculado 1a</b>	90	40
<b>Eyaculado 2</b>	80	40
<b>Eyaculado 2a</b>	90	40
<b>Promedio</b>	85 <sup>a</sup>	41.25 <sup>b</sup>

a y b muestran una diferencia estadística significativa ( $P>0.05$ )



**Gráfica 8.** Porcentaje de movilidad espermática antes y después del sexado para muestras utilizadas en citómetro de flujo.

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron que no hay diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre el sexo de las crías nacidas en las borregas inseminadas con semen sexado mediante la técnica de centrifugación en gradientes de Ficoll-diatrizoato de sodio, esto posiblemente se deba a que el número de hembras inseminadas fue reducido. Sin embargo, los resultados obtenidos por citometría de flujo nos permiten sugerir que existió un enriquecimiento de la población X, lo que coincide con el número hembras nacidas. El enriquecimiento de los espermatozoides X fue obtenido siguiendo las modificaciones propuestas por López<sup>88</sup>, como centrifugar la muestra solo 15 min.

Cabe mencionar que en el trabajo de López<sup>88</sup>, utilizando la misma técnica reportada por Vázquez<sup>15</sup> no se logró el enriquecimiento de la población de espermatozoides X. Vázquez<sup>17</sup> reportó un enriquecimiento del 80% la población de espermatozoides X en la especie bovina, validada por PCR-tr. Pero es importante puntualizar que en ese estudio no fue inseminado el semen enriquecido con la población X, siendo este el método más definitivo para evaluar el grado de separación de las dos poblaciones de

espermatozoides por lo tanto, evaluar la relación de sexos de las crías en las hembras inseminadas con la población enriquecida de X o Y. <sup>92</sup>

Además en el estudio realizado por Vázquez no se realizó la evaluación de la viabilidad espermática, daño espermático, motilidad e integridad de membrana, datos que nos permiten obtener una mejor fertilidad al momento de inseminar.<sup>102</sup>

Por otra parte, aunque la técnica de PCR-tr es una prueba altamente sensible presenta una probabilidad, relativamente alta de obtener falsos positivos por contaminación (citado por López<sup>88</sup>), además de que la información que proporciona es cuantitativa.<sup>102, 103</sup>

Una de las limitaciones en el proceso de centrifugado del semen es que causa una gran pérdida de espermatozoides<sup>104</sup>, ésta pérdida puede variar alrededor de un 25% cuando el semen es diluido y centrifugado entre 400 x g y 700 x g durante 10-15 min<sup>105, 106</sup>, encontrándose además que la movilidad del espermatozoide no decae drásticamente cuando la fuerza de centrifugación es más baja.<sup>107</sup> Contrario con lo antes mencionado, en este trabajo se observó que la centrifugación de  $160 \times 10^6$  espermatozoides para el sexado de los mismos permitió la

recuperación en promedio del 45% de las células, presumiblemente portadoras del cromosoma X, mostrando así sólo la pérdida del 5% de espermatozoides. Sin embargo, la movilidad espermática mostró un decremento significativo (45% y 60%), coincidiendo con lo ya reportado y obteniendo resultados similares a lo reportado por López<sup>88</sup>. Las posibles causas negativas, al someter al espermatozoide a este tipo de estrés, puede ser daño a la integridad de membrana, lo que puede a su vez afectar su capacidad fertilizadora<sup>108, 109</sup>; o también puede ser debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>110, 111</sup>, que ocasionan alteraciones del funcionamiento de la membrana plasmática de los espermatozoides.<sup>112, 113</sup>

Por otra parte, en el caso del semen sexado el tiempo transcurrido entre la colecta y la inseminación artificial también pudo haber afectado la movilidad espermática; se sabe que almacenamientos o transportes prolongados no les otorgan a las células las condiciones fisicoquímicas que necesitan para sobrevivir adecuadamente<sup>114</sup>; es decir una disminución en el metabolismo del espermatozoide por agotamiento de los sustratos energéticos puede ocasionar que disminuya la movilidad espermática.<sup>115</sup> Adicionalmente, los cambios de temperatura, que se dieron desde la

colecta del semen hasta la inseminación de los espermatozoides sexados, de igual forma pudieron causar alteraciones en la membrana espermática, disminuyendo la calidad del semen así como la vida útil del mismo.<sup>114</sup>

De manera importante, se ha reportado que el diatrizoato de sodio tiene una interacción iónica con las moléculas por lo que posiblemente éste compuesto pudo interaccionar iónicamente con el espermatozoide, ya que en esta célula presenta carga en la membrana una vez que se le retira el plasma seminal (citado por López<sup>88</sup>).

Ricci menciona que en espermatozoides de bovino la centrifugación en gradientes de densidad permite obtener espermatozoides viables con una buena movilidad progresiva.<sup>116</sup>

Chávez<sup>89</sup>, utilizando la misma técnica de sexado empleada en este estudio, pero en semen de bovino, reportó una viabilidad de 80.57% después del sexado y de 72.71% al descongelado de este tipo de muestra. Respecto a esto se ha reportado que los espermatozoides de los bovinos y equinos son menos sensibles a la centrifugación que otros mamíferos (citado por Machado<sup>117</sup>), posiblemente a eso se debe que el toro tenga una mayor tolerancia al estrés para el proceso de sexado.<sup>118</sup> En nuestro estudio se obtuvo

una viabilidad de 56.25% después del sexado, lo cual posiblemente pudo haber sido causado por los motivos antes referidos.

En relación a la prolificidad, en borregas puede verse afectada por múltiples factores entre ellos está la edad y la raza<sup>97, 119</sup>. En este estudio se utilizaron hembras primíparas para la inseminación del semen sexado, lo cual posiblemente influyó en el resultado obtenido, ya que estas tienden a presentar una menor prolificidad que aquellas que son multíparas<sup>119, 120</sup>.

Por otro lado, algunos autores mencionan que el tiempo óptimo para la inseminación, después de retirar las esponjas vaginales es entre 48 y 65 hrs; tempranamente a las 36 hrs o máximo 72-78 hrs después, en este estudio, en el caso del semen sexado, la inseminación se realizó aproximadamente 60 horas después, lo que posiblemente pudo haber influido en la baja fertilidad obtenida en este grupo.<sup>121</sup>

El porcentaje de fertilidad obtenido en este estudio se considera dentro de los rangos aceptables (50%) a nivel de campo, al emplear inseminación cervical, según varios registros.<sup>121, 122</sup> Stojanov, empleando este tipo de inseminación obtiene entre 50% y 53% de fertilidad con

dosis de inseminación de 20 a 40 millones de espermatozoides motiles y de 51% con dosis de 80-100 millones <sup>123</sup>; mientras que Donovan, empleando inseminación intra-cervical y utilizando pajillas de semen congelado reporta 58% de fertilidad, mencionando que mínimas variaciones de fertilidad en las hembras pueden deberse a diferencia del semen entre machos.<sup>117, 124, 125</sup> Por su parte, Macedo menciona que la proporción de sexos en una camada se relaciona también con el semental utilizado<sup>125</sup>, además de verse afectada por el tipo de inseminación.<sup>118</sup>

La doble inseminación es un método utilizado para incrementar la fertilidad<sup>117</sup>, pudiéndose realizar en las siguientes 8-10 hrs después de la primera inseminación o en rango de 24 hrs obteniendo un incremento hasta del 10% en la fertilidad.<sup>125</sup>

En este estudio sólo se realizó sólo una inseminación, por lo que posiblemente el realizar dos inseminaciones podría mejorar la fertilidad o está también podría incrementarse al emplear la inseminación por laparoscopia, ya que con ella se puede obtener hasta el 80% de fertilidad a inseminar con un menor número de espermatozoides .<sup>126, 127</sup>

Cabe mencionar que en el caso de la borrega, la fertilidad puede haberse afectada al emplear la inseminación cervical, ello debido a la estructura anatómica del cérvix<sup>128</sup>; ya que éste es un órgano tubular largo y fibroso, en donde el lumen es tortuoso y presenta 4-7 anillos, por lo que representa una barrera para la inseminación cervical<sup>129</sup> ya que una gran cantidad de espermatozoides quedan atrapados en los pliegues mucosos y en tanto los factores fisicoquímicos e inmunitarios de la vagina y el cuello uterino tienen una función importante en la supervivencia de los espermatozoides<sup>14</sup>

Por otra parte, en este estudio sólo se inseminaron 24 animales, por lo que se observó diferencia numérica entre el sexo de las crías nacidas en las hembras inseminadas con semen sexado esto no fue estadísticamente significativo; por que coincidimos con lo mencionado por Amann que para valorar la proporción del sexo de las crías es necesario determinar el número de observaciones necesarias para obtener una conclusión adecuada y minimizar con ellos los errores de probabilidad, siendo necesario el mayor número de observaciones para tener una mejor certeza.<sup>130</sup>

Por otro lado, respecto al número de espermatozoides utilizados en citometría de flujo del 100% de espermatozoides ingresados al citómetro de flujo un 20% termina colectado en la fracción X y un 20% en la fracción Y y el 60% restante son espermatozoides que no pudieron ser detectados, es decir espermatozoides muertos y gotas sin esperma. Adicionalmente este tipo de semen congelado en pajillas de 0.25 ml, están a una concentración de 2 o 10 x 10<sup>6</sup> espermatozoides dosis a la que normalmente se utiliza en la IA. Tomando en consideración éstos datos, la velocidad que se maneja el citómetro, éste produce 7 pajillas de 2 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides X o Y por eyaculado<sup>66</sup> y en contraste, con el sexado de semen por centrifugación se recupera una pastilla de aproximadamente la mitad de las células depositadas, por lo tanto se obtendría un mayor número de pajillas de 0.25 ml.

Si bien la citometría de flujo un método de separación importante en la investigación biomédica y en el laboratorio clínico, debido a su capacidad para el análisis automático de suspensiones celulares<sup>131</sup>, se ha utilizado como una herramienta de validación, sin embargo se sigue buscando una alternativa para sexado de semen.<sup>11</sup> En este estudio el uso de la citometría de flujo para

validar la técnica de sexado por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio, mostró un 68% en el enriquecimiento de la población X de espermatozoides de ovino (gráfica 5), considerándose como un dato relevante y de utilidad para continuar con más investigaciones para que en un futuro Pudiera emplearse a nivel de campo ya que cualquier centro de producción podría contar con el material necesario para llevarla a cabo.

Por tal motivo, la comercialización de semen sexado dependerá del desarrollo de esta o de otra técnica que logre ofertar un precio adecuado y así lograr un consumo importante en la ganadería; esto impulsaría su utilización masiva, y por tal motivo reduciría el costo.

## 9. CONCLUSIONES

- El sexado de semen por la técnica de centrifugación en gradiente de Ficoll-diatrizoato de sodio permitió un mayor número de hembras nacidas, en la especie ovina, obteniendo 68% de enriquecimiento de la población X de espermatozoides validada por citometría de flujo.
- El uso de 2 diferentes machos para el sexado del semen y su uso en la Inseminación artificial dificulta su evaluación de la fertilidad para cada macho, por lo cual se requiere utilizar 1 solo macho, pero en este estudio por motivos del manejo genético en CEIEPO se utilizaron 2 machos.
- El sexado y el transporte de la muestra al laboratorio de la FMVZ a CEIEPO dificultó el manejo en los animales, por lo que el realizar el experimento en un solo lugar podría optimiza los resultados.
- El uso de la citometría de flujo para la validación del sexado del semen por gradiente de densidad Ficoll-diatrizoato de sodio permitirá hacer las mejoras necesarias a la técnica en un menor tiempo.

## 10. PERSPECTIVAS

- Es necesario seguir estandarizando la técnica de centrifugación en Ficoll-diatrizoato de sodio para lograr obtener el 80% o más de enriquecimiento de la población de espermatozoides X o Y en el ovino.
- Evaluar la viabilidad del semen de todos los machos utilizados antes y después del sexado.
- Se requiere de inseminar un mayor número de animales (N=200) para determinar la proporción de sexos en las crías, así como la fertilidad y prolificidad y obtener diferencias estadísticas significativas.
- Realizar doble inseminación cervical o utilizar la inseminación por laparoscopia pudiendo utilizar un menor número de espermatozoides viables para obtener un mayor porcentaje de fertilidad.
- Al Realizar las modificaciones pertinentes a ésta técnica se podría inseminar, y comparar el sexado por citometría de flujo para valorar ventajas y desventajas, así como la criopreservación del semen.
- Evaluar el enriquecimiento de la población Y por centrifugación en gradientes de Ficoll-diatrizoato de sodio.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. TAMARIN R. *Principles of genetics*. McGraw-Hill, 1999.
2. NICHOLAS F. *Introducción a la genética veterinaria*. Acribia, 1998.
3. PARRILLA I, Vázquez JM, Martínez EA. *Estado actual de la selección de sexo en el ganado porcino*. Avances en Tecnologías Porcinas, 2(10), 57-71, 2005.
4. FMVZ-UNAM, *Manual de prácticas en Reproducción*, Departamento de Reproducción, México, UNAM, 1979.
5. ROSALES T, Herrera G, Vergara M, Rosado G. *Diferenciación sexual en el sistema nervioso central*. Veterinaria México, 36(3): 339-360, 2005.
6. JOHNSON L, Welch G. *Sex preselection: high-speed flow Cytometric sorting of x and y sperm for maximum efficiency*. Theriogenology.52:1323-1341, 1999.
7. GEORGE E, Seidel J. *Sexing mammalian sperm intertwining of commerce, technology and biology*. Animal Reproduction Science, 79,145-156, 2003.
8. FELMER B. *Animales transgénicos: pasado, presente y futuro*. Archivos de Medicina Veterinaria; XXXVI (2): 105-117, 2004.
9. GARNER D, Seidel J. *History of commercializing sexed semen for cattle*. Theriogenology.69:886-895, 2008.

10. CRUZ G. *Evaluación de la eficiencia de un equipo de citometría de flujo y dos fluorocromos para el sexado de semen congelados en bovinos.* Tesis de Maestría en Ciencias, FMVZ-UNAM ,2005.
11. VÁZQUEZ J, Parrilla I, Roca J, Gil M, Cuello C, Vazquez J, Martinez E. *Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives.* *Theriogenology*, 71:80-88, 2009.
12. HAFEZ B. *Reproducción e inseminación artificial en animales.* Ed. Mc Graw-Hill 2002.
13. BEERNINK F. *Techniques for separating X and Y spermatozoa: in foundations of in vitro fertilization.* Presented at the Annual Meeting of the American Fertility Society, New Orleans. 1986.
14. KOWALSKI L. *Determinación y preselección del sexo en ganadería bovina. Manual de Ganadería doble Propósito.* Decanato de Agronomía, Departamento de Producción Animal. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, 2005.
15. VÁZQUEZ A. *Sexaje de espermatozoides de bovino mediante centrifugación en gradientes de densidad.* Tesis de licenciatura, FMVZ-UNAM 2008.
16. JAFAR S.I., Flint A.P.F., *Sex selection in mammals: Review,* *Theriogenology* 46:191-200, 1996.

17. MITTWOCH U. *Sex Determination in Mythology and History*, Arq Bras Endocrinol Metab, 49:1, 2005.
18. GONZÁLEZ T.Y. *Sexualidad y Religión*, Arqueología Mexicana, XVIII: 104, 2010.
19. MENDIOLA O.J, Ten J., Vivero G., Roca M., Bernaben R., *Esterilidad y Reproducción Asistida: Una perspectiva Histórica*. Revista Iberoamericana de Fertilidad, 22:1 2005.
20. BERMEJO B. JC., *Consideraciones acerca del estudio del parentesco en la Grecia Antigua: Nota a Esquilo, Euménides vs 658 a668*.
21. CUEVAS I, Llácer J, Ten J, Mendiola J, Bernabeu R, *Situación actual de la selección del sexo*. Revista Iberoamericana de Fertilidad, 19:5, 2002.
22. CANTARELLI P.M.L, Rheingantz T.M.G, Palma G.A, *Selección del Sexo en los mamíferos*.
23. WINDSOR D.P, Evans G, White I.G, *Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a Review*, Reproduction Fertility Dev., 5,155-171, in 1993.
24. MORRUZI J.F., *Selecting a mammalian species for the separation of X and Y chromosome bearing spermatozoa*, Journal Reproduction Fertility, 57,319-323, 1979.

25. DEBUSE M, *Lo esencial en sistema endocrino y aparato reproductor*, Cursos Crash Demosby, Harcourt Brace, España, 1998.
26. MOORE K.L., *Embriología clínica*, 4ª. Edición, Interamericana Mc Graw-Hill, México, 1988.
27. VALERIE J.G., Lawrence W.Ch., *Can mammalian mothers influence the sex of their offspring peri-conceptually?* , *Reproduction*, 140, 425-433, 2010.
28. SEIDEL JR. *Sperm sexing technology- the transition to commercial application An introduction to the symposium "Update on sexing mammalian sperm"*, *Theriogenology*, 71, 1-3, 2009.
29. SEIDEL GE, Johnson L.A., *Sexing mammalian sperm*. *Theriogenology* 52, 1267-1272, 1999.
30. MAXWELL WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R., De Graaf S.P., Eriksson B.M., O'Brien J.K., *Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox*, *Animal Reproduction Science*, 82-83, 79-95, 2004.
31. SCHENK JL, De Grofft DL, *Insemination of cow elk with sexed frozen semen*. *Theriogenology*, 59, 514, 2003.
32. O'BRIEN JK, StojanovHeL, Birrell AM, Maxwell WMC, Evans G. *Preliminary developments of sperm sorting technology in non-human primates*, *Biol. Reprod.* 64 (suppl.1), 158 (abstract), 2001.

- 33.** SCHENK JL, Suh TK, Cran DG, Seidel GE, *Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa*, *Theriogenology*, 52:1375-1391, 1999.
- 34.** SEIDEL Jr. GE, *Economics of selecting for sex: the most important genetic trait*, *Theriogenology* 59, 585-598, 2003.
- 35.** VALENCIA MJ, *Situación actual y perspectivas del sexado del semen*, *Memorias científicas, XXV congreso nacional de Buiatría*, 87-91, 2001.
- 36.** HOHENBOKEN W.D, *Applications of sexed in cattle production*, *Theriogenology*, 52:1421-1433, 1999.
- 37.** HOSSEIN ZadehNavidGhavi, Nejati-JavaremiArdeshir, Miraei-AshtianiSeyed Reza, *Bio-economic evaluation of the use of sexed semen at different conception rates and herd sizes in Holstein populations*, *Animal Reproduction Science*, 121, 17-23, 2010.
- 38.** JOHNSON LA, *Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art*, *Animal Reproduction Science*, 60-61, 93-107, 2000.
- 39.** GRAAF DE SP, Beilby KH, Underwood S.L, Evans G, Maxwell WMC, *Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule*, *Theriogenology*, 71:89-97, 2009.
- 40.** JOHNSON LA, Flook JP, Hawk HW. *Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA*

and cell sorting. *Biology Reproduction*, 41:1999-203, 1989.

**41.** JOHNSON LA. *Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X and Y bearing sperm*, *Reproduction domestic animal*, 26:309-314, 1991.

**42.** CRAN DG, Johnson LA, Miller NGA, Cochrane D, Polge C. *Production of bovine calves following separation of X chromosome and Y chromosome bearing sperm and in vitro fertilization*. *Vet Record*, 132:40-41, 1993.

**43.** CATT SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WMC, Evans G. *Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm*. *Vet Record*, 139:494-495, 1996.

**44.** LEVINSON G, Keyvanfar K, WuJC, Fugger EF, Fields RA, Harton GL, et al. *DNA based X enriched sperm separation as an adjunct to pre-implantation genetic testing for the prevention of X linked disease*. *Human Reproduction*, 10:979-982, 1995.

**45.** BUCHANAN BR, Seidel Jr GE, McCue PM, Schenk JL, Herickhoff LA, Squires EL. *Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa*. *Theriogenology*, 53:1333-1344, 2000.

46. PRESICCE JK, Rath D, Klinc P, Senatore EM, Pascale M. *Buffalo calves born following AI with sexed semen.* *Reproduction Domestic Animal*, 40:349,2005 (abstract).
47. O'BRIEN JK, Roberck TR. *Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (Tursiopstruncatus).* *ReprodFertilDev*, 18:319-329, 2006.
48. MEYERS MA, Burns G, Am D, Schenk JL. *Birth of canine offspring following insemination of a bitch with flow sorted spermatozoa.* *ReprodFertil Dev*,20, 213, 2008 (abstract).
49. POPE CE, Crichton EB, Gomez MC, Dumas C, Dresser B. *Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow sorted spermatozoa.* *ReprodFertilDev*, 20:213-214, 2008.
50. PEARSON P.L, Bobrow, M. and Vosa C.G. *Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei.* *Nature (London)*, 226: 79-80, 1970.
51. ROBERTS, AM, *The effect of lactic acid sodium bicarbonate on the sex ratio,* *J. Hered*, 31:499-500, 1940.
52. GORDON, MJ, *Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa.* *Proc Natt Acad Sci USA*, 43:913-918, 1957.

53. STEENO O, Adimoelia A, Steeno J, *Separation of X and Y bearing human spermatozoa with the Sephadex gel filtration method*, *Andrología*, 7:95, 1975.
54. HARE WCD, Betteridge KJ, *Relationship of embryo sexing to other methods of prenatal sex determination in farm animals: a review*, *Theriogenology*, 9:1, 27-43, 1978.
55. ERICKSSON,RL, Langevin CN, and Nishino M, *Isolation of fractions rich in human Y sperm*, *Nature (London)*, 246: 421-424, 1973.
56. KANEKO S, Oshio S, Kobayashi T, Mohri T, Tizuka R. *Selective isolation of human x bearing sperm by differential velocity sedimentation in Percoll density gradients*. *Biomed Res*, 5: 187-194, 1984.
57. KANEKO S, Yamagushi J, Kobayashi T, Lizuka R, *Separation of human X and Y bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation*, *FertilSteril*, 40:661-665, 1983.
58. MOHRI H, Oshio S, Kaneko S, Kobayashi T, Lizuka R. *Separation of X and Y bearing sperm*. *Dev Growth Differ (Suppl.)*, 28:35-36, 1986.
59. LIZUKA R. Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T. *Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application*. *Human Reprod*. 2:573-575, 1987.

- 60.** UPRETI GC, Riches PC, Johnson lA. *Attempted sexing of bovine spermatozoa by fractionation on a Percoll density gradient.* Gamete Res. 20:83-92, 1988.
- 61.** KHAIRY MA, Zoheir, Ahmed A, Allam. *A rapid method for sexing the bovine embryo.* Animal Reproduction science, 119:92-96, 2010.
- 62.** PINKEL D, Gledhill BL, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA. *Sex preselection in mammals? Separation of sperm bearing Y and "O" chromosomes in the vole Microtusoregoni.* Gamete Res. 16:1-9, 1982.
- 63.** GARNER DL, Seidel Jr. G.E. *History of commercializing sexed semen for cattle,* Theriogenology, 69:886-895, 2008.
- 64.** SCHENK J. Seidel G. Jr. *Imminent Commercialization of Sexed Bovine Sperm.* Proceedings. The Range Beef Cow Symposium XVI, December 14, 15, and 16, 1999 Greeley, Colorado.
- 65.** SEIDEL G. E., Jr. *Overview of sexing sperm.* Theriogenology. 68:443 - 446. 2007.
- 66.** OSES M. *Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in Vitro.* Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2009.

- 67.** GARNER D. Seidel GE Jr. *Sexing bull sperm*. College of Veterinary Medicine and Biological Sciences, Colorado State University, 2000.
- 68.** 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*, 10: 2, 581-587, 2009.
- 69.** GARNER D. *Sex-Sorting Mammalian Review Sperm: Concept to Application in Animals*. *Journal of Andrology*, 22:4, 2001.
- 70.** GARNER DL. *X and Y chromosome bearing mammalian sperm*, Gameto Biology Consulting, USA, *Theriogenology*, 71:11-21, 2009.
- 71.** HAUGLAND RP, *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*, 8<sup>th</sup>. Ed. Eugene, OR: molecular Probes, 2001.
- 72.** LEIBSON PJ, Loken MR, Shapiro SJ, Schreiber H. *Direct determination of the influence of the cell cycle in the survival of tumor cells exposed to cytotoxic antibodies*. *Cancer Res*, 40:56, 1980.
- 73.** ERBA E, Ubezio P, Brogginini M, Ponti M, D'Incalci M. *DNA damage, cytotoxic effect and cell cycle perturbation*

of Hoechst 33342 on L1210 cell in vitro. *Cytometry*, 9:1-6, 1988.

**74.** WATKINS A, Chan PJ, Kalugdan TH. *Analyses of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa.* *Mol Hum Reprod*, 2:709-712, 1996.

**75.** SPINACI M, Ambrogi M De, Volpe S, Galeati G, Tamanini C, Seren E. *Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development,* *Theriogenology*, 64:191-201, 2005.

**76.** RICKWOOD D. *Centrifugation. A practical approach.* IRL Press. Oxford, England. 82-87, 1984.

**77.** KARP G. *Biología celular y molecular.* McGraw Hill, 5ª edición, 2005.

**78.** DE DUVE C, Beaufay H. *A short history of tissue fractionation,* *The Journal of Cell Biology*, 1:3; 293-299, 1981.

**79.** FREIFELDER DM. *Técnicas de bioquímica y biología celular.* Reverte. Barcelona. 297-380, 1981.

**80.** COOPER T. *Instrumentos y técnicas de bioquímica.* Reverte. Barcelona, España. 339-348, 1984.

**81.** BRAKKE MK. *The origins of Density Gradient Centrifugation fractions.* *Fractions*, 1:242-250, 1979.

- 82.** ALBERTS B. *Molecular biology of the cell*. Barcelona. Medica Panamericana.2006.
- 83.** FLAHERTY S, Michalowska J, Swann J, Dmowski W, Mathews C, Aitken R. *Albumin gradients do not enrich and bearing human spermatozoa*. Human Reproduction, 12(5), 398-9421997.
- 84.** WANG HX, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD. *Assessment of the separation of X and Y bearing sperm on albumin gradients using double label fluorescence in situ hybridization*. FertilSteril. 64:4, 720-726, 1994.
- 85.** PARETI K, BongioniG, Aleandri R, Galli A. *Sex determination in bovine semen, a new approach by quantitative real time PCR*. Theriogenology, 66:9, 2202-2209, 2006.
- 86.** SHASTRY P. *Used of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X and baring spermatozoa*. Nature, 269, 5860, 1977.
- 87.** HOSSEPIAN DE LIMA V. *Avanços metodológicos na seleção do sexo deespermatozóides bovinos para utilização no melhoramentogenético e na produção animal*. Revista Brasileña de Zootecnia.36, 219 - 228, 2007.
- 88.** LÓPEZ, L.G.U, *Valoración de la eficiencia de la centrifugación en gradientes de densidad para el sexado*

de espermatozoides sobre el sexado de las crías en ovinos. Tesis de Maestría en Ciencias, UNAM-FMVZ, 2010.

**89.** CHÁVEZ, G.A. *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.* Tesis de Maestría en Ciencias, UNAM-FMVZ, 2011.

**90.** LOMONTE, B. *Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica,* Universidad de Costa Rica, 122 pp. 2009.

**91.** DURÁN Del CA. *Anatomía, fisiología de la reproducción e Inseminación artificial en ovinos,* Hemisferio sur, Agropecuaria, Uruguay, Montevideo.

**92.** BECKETT TA, Martin RH, Hoart DI. *Assessment of the Sephadex technique for selection of x bearing human sperm by analysis of sperm chromosomes, deoxyribonucleic acid and y bodies.* Fertile Steril, 52:5, 829-835, 1989.

**93.** MAXWELL WMC, Watson, PF. *Recent progress in the preservation of ram semen.* Animal Reproduction. Science, 42:55-65, 1996.

**94.** FULLER WB, Spencer TE. *Reproductive biology in the era of genomics biology.* Theriogenology, 64, 442-456, 2005.

- 95.** BEDOLLA, CC. *Técnicas de Inseminación artificial en ovinos*, FMVZ. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- 96.** GALINA C, Valencia J, *Reproducción de los Animales domésticos*, Reproducción de ovinos, 2008.
- 97.** GRAAF De SP, Evans G, Maxwell WMC, O'Brien JK. *In vitro function of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa after sex-sorting and re-freezing*. *Reprod. Fertil. Dev.*18, 867-874, 2006.
- 98.** MEJÍA V.O.V. *Evaluación, dilución y congelación de semen ovino: Manejo de semen (fresco y congelado) e Inseminación artificial en Ovejas*, Centro de enseñanza, Investigación y Extensión en producción Ovina (CEIEPO), FMVZ-UNAM, pp. 14-17.
- 99.** MERLO, B.M.A. *Evaluación de las tinciones de Kovacs y Foote y eosina-nigrosina para la detección de fallas acrosomales en espermatozoides de cerdo*, Tesis de licenciatura, FMVZ-UNAM, 1996.
- 100.** GUTIÉRREZ, P.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 doctorado en Ciencias, FMVZ-UNAM, 2009.

- 101.** MEJÍA V.O.V. *Antecedentes de la inseminación artificial en pequeños rumiantes: Manejo de semen (fresco y congelado) e Inseminación artificial en Ovejas*, Centro de enseñanza, Investigación y Extensión en producción Ovina (CEIEPO), FMVZ-UNAM, pp.7-9.
- 102.** WELCH GR, Waldbieser GC, Wall R and Johnson L.A, *Flow Cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X and Y chromosome bearing bovine sperm*, *Animal Biotechnology*, 24,235-245, 1995.
- 103.** WELCH GR, and Johnson LA, *Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X and Y sperm by sort reanalysis for DNA*, *Theriogenology*, 52, 1343-1352, 1999.
- 104.** GIL J, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. *Influence of centrifugation and different extender son post-thaw sperm quality of ram semen*. *Theriogenology*, 54, 93-108, 2000.
- 105.** LOOMIS PR, *Advanced methods for handling and preparation of stallion semen*. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 22, 663-676, 2006.
- 106.** AURICH C. *Recent advances in cooled-semen technology*. *Animal ReprodSci*, 107, 268-75, 2008.
- 107.** HOOGEWIJS M, Rijsselaere, T, De VliegheS, Vanhaesebrouck E, De Schauwer C, Govaere J, Trys M,

Hoflack G, Van Soom A, De Kruif A. *Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation*, Theriogenology, 74, 118-126, 2010.

**108.** STOREY BT. *Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa*. Mol Hum Reprod 3, 203-213, 1997.

**109.** CASSANI P, Beconi MT, O'Flaherty C. *Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen*. Anim Reprod Sci, 86, 163-173, 2005.

**110.** CHATTERJEE S, Gagnon C. *Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing*. Mol Reprod Dev, 59,451-458, 2001.

**111.** CHATTERJEE S, Laloraya M, Kumar PG *Free radical-induced liquefaction of ejaculated human semen: a new dimension in semen biochemistry*. Arch Androl. 38:2,107-111, 1997.

**112.** URREGO R. Ríos A, Olivera M. *Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos*, Rev Colomb Cienc Pecu, 21,19-26. 2008.

**113.** BOE-HANSEN GB, Morris ID, Annette B, Ersbølla K, Greve T, Christensen P. *DNA integrity in sexed bull sperm*

*assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. Theriogenology, 63, 1789-802, 2005.*

**114.** BEARDEN JH. Fuquay JW. *Reproducción animal aplicada, el manual moderno, México, 1982.*

**115.** RIVERA VRE. *Evaluación de 3 diluyentes en semen porcino para uso a 96 y 129 hrs posteriores a la colecta, Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1997.*

**116.** RICCI G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G. *Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim up versus gradient-density centrifugation technique. Fertility and Sterility, 91:2, 2009.*

**117.** MACHADO GM, Carvalho JO, Filho SE, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN, *Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos, Theriogenology, 71, 1289-1297, 2009.*

**118.** WINDSOR, DP. *Factors influencing the success of transcervical insemination in merino ewes, Theriogenology, 43, 1009-1018, 1995.*

**119.** VITTO R, García J, Acevedo E, Asenjo B, Ciria J. *Evaluación de algunos factores que afectan la prolificidad en una explotación caprina del Estado*

*Tachira, Venezuela. II: Efecto del número de parto, edad al parto y época de parto, Reproducción, XXV: Comunicación 17, 2000.*

**120.** CEA R, Jurado JJ, Serrano M, Equipo veterinario de Carnes Oviaragón SCL, *Influencia de la edad al primer parto sobre la prolificidad y estudio del intervalo entre partos en la raza ovina "rasa aragonesa" en el contexto del esquema de selección de la UPRA- CARNES OVIARAGÓN, Reproducción, XXV: Comunicación 23, 2000.*

**121.** SALOMON S, Maxwell WMC. *Storage of ram semen, Animal Reproduction Science, 62, 77-111, 2000.*

**122.** O'HARA L, Hanrahan JP, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans ACO, Lonergan P. *Effect of storage duration, storage temperature, and diluents on the viability and fertility of fresh ram sperm, Theriogenology, 73, 541-549, 2010.*

**123.** STOJANOV, V.K., *An experiment on deep-cervical insemination of sheep with frozen semen (in Russian). Zhivotnovodstvo, 1, 45-46, 1980.*

**124.** DONOVAN A. Hanrahan JP, Kummen E, Duffy P, Boland MP. *Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronisedo estrus, Animal Reproduction Science, 84, 359-368, 2004.*

- 125.** MACEDO R, Arredondo V, Esperón E, Hummel JD. *Factores que influyen sobre la proporción del sexo de la camada de corderos pelibuey prolíficos bajo condiciones intensivas.* Memorias del XXXI Congreso Nacional de Buiatría, XIII congreso Latinoamericano de Buiatría, Dr. Jorge Ávila García, 2007.
- 126.** SALOMON S, Maxwell WMC. Review: *Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement,* Animal Reproduction Science, 38, 1-36, 1995.
- 127.** SAACKE RG, Nadir S, Nebel RL. *Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants.* Theriogenology, 41, 45-50, 1994.
- 128.** KERSHAW CM, Khalid M, McGowan R, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. *The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen,* Theriogenology, 64, 1125-1235, 2005.
- 129.** MAXWELL, W.M.C. and Butler, L.G. *Fertility of ewes following intra-uterine insemination using a laparoscope compared with other methods.* Proc. Aust. Assoc. Anim. Breed. Genet, 4,192-193, 1984.
- 130.** AMANN RP, *Treatment of sperm to predetermine sex,* Theriogenology, 31:1, 49-60, 1989.

**131.** LUQUE, JHA. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética .conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.* Elsevier, España, 2008.