



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Evaluación del potencial fertilizante *in vivo* de los espermatozoides criopreservados de ovino sexados por la Técnica de Centrifugación en Gradiente de Densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

YARA GRACIELA ROJAS NAVA

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA (FMVZ UNAM)

CÓMITE TUTORAL:

DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO (Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal)
DR. OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA (CEIEPO FMVZ UNAM)

México, D.F. Octubre 2014



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.

...Porque todo el que pide, recibe; y el que busca halla; y al que llama; se le abrirá... (Mateo 7:8)

AGRADECIMIENTOS

Dra. Lourdes A. Arriaga Pizano

Todo mi cariño, respeto y admiración, es una gran persona y me voy muy contenta de haberla conocido y haber trabajado al lado de usted. Me ha ayudado a crecer como persona y como profesional, además de haberme contagiado su gran pasión y vocación por la citometría de flujo.

M en C Juan Alberto Balcázar Sánchez

Quiero expresar mi gran aprecio por usted, por ser un excelente ser humano, escucharme, apoyarme y guiarme, tanto en lo personal como en lo profesional y ser parte de este proyecto.

Dr. Oscar Gutiérrez Pérez

Tomo mi respeto, admiración, por ser una persona siempre dispuesta a colaborar y a ayudar, mil gracias por resolver mis dudas, tus aportaciones y consejos.

Dr. Octavio Mejía Villanueva

Por su participación y aportaciones a este trabajo.

Dr. Alejandro Benítez

Por facilitarme las instalaciones y manejo del microscopio de fluorescencia para la concluir este proyecto, así como por escucharme.

MPA. Frida Salmerón Sosa

Por su paciencia, comprensión y ayuda.

Mi familia

A mis **padres** por siempre sostenerme cuando me caigo y siempre estar pendiente de mí, espero regresarles algún día con creces todo lo que han dado. Son mi ejemplo a seguir.

Mis **hermanos**, a pesar de estar lejos siempre están apoyarme incondicionalmente, espero algún día podamos volar tanto como sea posible para tocar las nubes.

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda

Por darme la oportunidad de iniciar este proyecto y contribuir a mi formación como profesional.

M.C. Esteban Domínguez Cerezo

Agradezco el apoyo, disposición y aportaciones para este trabajo, mis días de trabajo eran muy amenos contigo.

M.C. Luis Ángel Flores Mejía

Agradezco tu paciencia, apoyo y pericia para concluir este trabajo.

Dr. Ismael Mancilla Herrera

Gracias por resolver mis dudas y la participación en este proyecto.

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Por sus consejos y apoyo, además de contribuir a mi formación profesional.

Dr. José Alfredo Medrano Hernández

Por los buenos comentarios, ajustes y crítica a este trabajo.

MVZ Erika E. Miguel Cruz

Por siempre estar ahí, para escucharme y apoyarme y simplemente brindarme tu amistad.

MVZ David Segura

Mi buen amigo y compañero de penas y agonías, supongo que nos espera algo mejor.

Gracias a todas las personas que indirecta o directamente contribuyeron e iluminaron mi camino para concluir un objetivo más en mi vida y que me han enseñado mucho en el camino.

ABSTRACT

The aim of this study was to separate X and Y bearing rams sperm using density gradient and the flow cytometry to valuate success. Spermatozoa were collected form six ram (2 suffolk and 3 dorset) with aged between 3-5 years and proven fertility; a total of 26 ejaculates were collected with an artificial vagina. To prepare discontinuous density gradient (1.070, 1.071 and 1.072 g/ml), Ficoll at 8% and 32.8% of sodium diatrizoato solutions were used; the solutions were layered one another respectively into a tube. Finally 1 ml semen sample (160×10^6 sperm/ ml) was loaded on the top layer. Then it was centrifuge at $567 \times g$ by minutes at room temperature. Progressive motility, viability and sperm concentration were evaluated before and after the treatment. After centrifugation 5 fractions were collected; the percentages of X and Y-bearing sperm were counted in the different layers by flow cytometric. Results have shown that means of percentage of Y-bearing sperm was better in the layer called the top fraction, which, showed an enrichment >70%. The viability of enriched fractions of spermatozoa was found no affected. The mitochondrial and acrosomal integrity showed a significant damage increase from the top to the bottom layer.

Subsequently samples from the top fraction were frozen in 0.25 ml straws at a concentration of 5×10^6 sperm. After the froze-thawed a 4% in progressive motility was obtained and a 5% for control group, found significant difference between groups ($p < 0.05$). Viability for sexed samples was of 74% and 73% for control group with no significant difference ($p > 0.05$) for both groups. After freezing no significant differences between groups ($p > 0.753$) were observed.

In conclusion, our study demonstrated that discontinuous Ficoll- sodium diatrizoato density gradients can be considered as low cost tool for sperm sexing of ram semen.

Keyword: sexed semen, centrifugation, Ficoll-diatrizoate of sodium, enrichment, spermatozoa, cytometric flow.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue separar espermatozoides X y Y de semen de ovino, utilizando gradientes de densidad y validado por citometría de flujo. Un total de 26 eyaculados fueron colectados de 6 machos (2 de raza suffolk, 3 de raza dorset) de fertilidad probada con edades entre 3 a 5 años y un total de 26 eyaculados fueron colectados empleando una vagina artificial. Para preparar el gradiente de densidad discontinuo (1.070, 1.071 y 1.072 g/ml), se empleó Ficoll al 8% y diatrizoato de sodio al 32.8% para cada fracción. Finalmente 1ml de semen (160×10^6 espermatozoides/ml) fue colocado sobre la fracción superior, enseguida fue centrifugado a $567 \times g$ por 15 minutos a temperatura ambiente. La viabilidad, motilidad progresiva y la concentración espermática fue evaluada antes y después del tratamiento. Posterior a la centrifugación se recuperaron 5 fracciones, las cuales de acuerdo con los resultados mostraron un enriquecimiento de la población de espermatozoides Y en la capa correspondiente a la fracción superior (70%) del gradiente, siendo validado por citometría de flujo. La viabilidad de las fracciones enriquecidas no se vio afectada. La integridad mitocondrial y acrosomal mostraron un daño significativo desde la fracción superior hasta la inferior.

Posteriormente, las muestras de la fracción superior fueron congeladas en pajillas de 0.25 ml a una concentración de 5×10^6 espermatozoides, al descongelado se obtuvo un 4% en la motilidad progresiva, mientras que para el control un 5%, existiendo diferencia significativa entre grupos ($p > 0.05$); la viabilidad fue de 74% para muestras sexadas y 73%

para el control, no encontrándose diferencia significativa para ambos grupos ($p>0.05$).

Después de la congelación no hubo diferencia significativa ($p>0.7533$) entre grupos.

En conclusión, este estudio demostró que los gradientes de densidad discontinuos con Ficoll-diatrizoato de sodio pueden ser considerados como una herramienta de bajo costo para el sexado de espermatozoides de ovino.

Palabras clave: semen sexado, centrifugación, Ficoll-diatrizoato de sodio, enriquecimiento, espermatozoide, citometría de flujo.

CONTENIDO

	Página
I. Introducción	12
II. Revisión bibliográfica	16
III. Justificación	40
IV. Objetivo General	41
V. Objetivos particulares	41
VI. Hipótesis	42
VII. Material y Métodos	42
VIII. Análisis estadístico	58
IX. Resultados	59
X. Discusión	74
XI. Conclusiones	88
XII. Bibliografía	89

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1** Valores descriptivos para los parámetros evaluados en los eyaculados de ovino antes del sexado por gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio.
- Cuadro 2** Valores descriptivos para la viabilidad espermática expresada en porcentaje para las 5 fases generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio.
- Cuadro 3** Valores descriptivos para la concentración espermática expresada en millones por mililitro para las distintas fases generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio.
- Cuadro 4** Valores descriptivos de la evaluación por citometría de flujo de las poblaciones espermáticas obtenidas de las distintas fracciones del gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio para el sexado del semen ovino.
- Cuadro 5** Medias por machos (n=6) de los espermatozoides X y Y, obtenidos de las fracciones generadas por el sexado y evaluados por citometría de flujo.
- Cuadro 6** Medias por raza (n=2) de los espermatozoides X y Y por fracciones obtenidas por el sexado y evaluadas por citometría de flujo.
- Cuadro 7** Valores descriptivos para los parámetros evaluados en los eyaculados de ovino antes del sexado para su posterior congelación.
- Cuadro 8** Valores descriptivos de las muestras obtenidas de la fracción sexada por gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, antes de la criopreservación.
- Cuadro 9** Porcentaje de la viabilidad espermática del semen sexado al descongelado comparada con el control.
- Cuadro 10** Evaluación del daño mitocondrial en espermatozoides de ovino al descongelado. No se encontró diferencia significativa entre grupos ($p>0.1579$).

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1** Valoración por citometría de flujo del enriquecimiento de espermatozoides X y Y en las distintas fases generadas por el sexado de semen con la centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio.
- Gráfica 2** Medias de los conteos de espermatozoides que presentaron integridad mitocondrial en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia estadística ($p < 0.0001$), para las fracciones de intermedio 1****, intermedio 2**** y pastilla**** comparadas con el control.
- Gráfica 3** Medias de los conteos de espermatozoides con daño mitocondrial para las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa de ($p > 0.0235$)* para la fracción de la pastilla.
- Gráfica 4** Medias de los conteos de espermatozoides que presentaron integridad acrosomal en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$) **, para la fracción superior ($p < 0.0092$) ** y anillo ($p < 0.0012$) ** comparadas con la pastilla.
- Gráfica 5** Medias de los conteos de espermatozoides con acrosoma integro y región post acrosomal en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$), para la fracción superior ($p < 0.0092$) y anillo ($p < 0.0012$) comparadas con la pastilla.
- Gráfica 6** Medias de los conteos de espermatozoides con fluorescencia difusa sobre la cabeza en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$) **, para la fracción superior ($p < 0.0092$) ** y anillo ($p < 0.0012$) ** comparadas con la pastilla.
- Gráfica 7** Medias de los conteos de espermatozoides que presentaron una pérdida del acrosoma en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$) **, para la fracción superior ($p < 0.0092$) ** y anillo ($p < 0.0012$) ** comparadas con la pastilla.

- Gráfica 8** Medias de los conteos de los espermatozoides que presentaron integridad mitocondrial al descongelado. No se encontró diferencia significativa entre grupos ($p > 0.7533$).
- Gráfica 9** Medias de los conteos para los espermatozoides que presentaron daño mitocondrial en espermatozoides de ovino al descongelado. No se encontró diferencia significativa entre grupos ($p > 0.1579$).
- Gráfica 10** Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides de ovino al descongelado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema de la generación del gradiente discontinuo de Ficoll-diatrizoato de sodio, así como de las fracciones obtenidas después de la centrifugación de las muestras.
- Figura 2** Imágenes de los patrones de tinción encontrados en las mitocondrias de los espermatozoides de ovino teñidos con MitoTracker Red CMXRos **A.** Fluorescencia en la pieza media completa. **B.** Disminución en la intensidad de fluorescencia en la pieza media. **C.** Fluorescencia incompleta de la pieza media. Las flechas indican la pieza media de los espermatozoides.
- Figura 3** Microscopia de fluorescencia de los patrones observados en los espermatozoides de ovino teñidos con FITC-PNA para evaluar el acrosoma. **A.** Espermatozoides con el acrosoma intacto. **B.** Fluorescencia en la región post-acrosomal y acrosomal, reacción acrosomal, presentando una tinción irregular. **C.** Fluorescencia en la región post-acrosomal.
- Figura 4** Gráficas del análisis por citometría de flujo de las poblaciones espermáticas X y Y de un eyaculado de ovino teñido con Hoechst 33342, sometido a la centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio. **A.** Gráfica de puntos, para observar las poblaciones utilizando la fluorescencia de Hoechst (Pacific blue-H) y la complejidad (SSC-A). **B.** Gráfica de puntos donde se observan las dos poblaciones espermáticas, utilizando su tamaño (FSC-H) y la fluorescencia de Hoechst (Pacific blue-A). **C.** Histograma de la fluorescencia de Hoechst donde se observa que la población de espermatozoides X (lila) contiene mayor contenido de DNA (densidad) y por lo tanto una mayor fluorescencia que el espermatozoide Y (azul).
- Figura 5** Gráficas del análisis por citometría de flujo de los núcleos espermáticos obtenidos del semen ovino, de muestras centrifugadas en gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio. **A.** Gráfica de puntos donde se observan los patrones de tamaño y complejidad de las poblaciones espermáticas. **B.** Gráfica de puntos, comparando las señales pico (H) y área (A) de la fluorescencia para yoduro de propidio (PE-Texas Red-H, PE-Texas Red-A), **C.** Histograma de la fluorescencia de yoduro de propidio donde se observa que la población de espermatozoides X (lila) contiene mayor contenido de DNA (densidad) y por lo tanto una mayor fluorescencia que el espermatozoide Y (azul).

INTRODUCCIÓN

De manera particular en la ganadería, los intentos por seleccionar 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 [1, 2].

Diferentes criterios han sido utilizados para la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X y Y [3], entre los que se encuentra el empleo de la diferencia de densidad que existe entre ellos [4].

El espermatozoide portador del cromosoma X es más denso que el portador del cromosoma Y, ello debido a que el cromosoma X es ligeramente más largo que el cromosoma Y [5]. Tomando en consideración lo anterior, dos métodos pueden ser empleados para separar dichas células por centrifugación: 1) el método de velocidad por sedimentación, influenciado por las diferencias de tamaño entre partículas, donde la velocidad de movimiento de la partícula varía al cuadrado de su dimensión y 2) el método de equilibrio por sedimentación que depende solamente de la diferencia de densidad entre partículas y el medio [5].

Para el método de velocidad por sedimentación los espermatozoides son centrifugados en un medio cuya densidad es menor que la de los espermatozoides, por lo tanto, los espermatozoides más pesados y de mayor densidad permanecerán en el fondo del tubo, por ende, los espermatozoides productores de hembras, deberán encontrarse más cerca del fondo del tubo de centrifugación, mientras que los espermatozoides productores de machos deberán estar más cerca de la parte superior del tubo [6].

El método de separación de partículas por equilibrio de sedimentación, se realiza empleando un gradiente de densidad discontinuo en donde la densidad de una de las soluciones deberá ser menor que la del espermatozoide, mientras que otra debe ser mayor. Después de un periodo de centrifugación, los espermatozoides deben quedar ubicados en el estrato igual a su propia densidad; no ocurriendo el movimiento posterior de los mismos [5].

La idea de la utilización de los gradientes de densidad surge en 1925 por Jay L. Lush [7], pero fue Harved el primero en emplearla en los espermatozoides de humano, utilizando un medio Dextrina-Ringer con una densidad aproximada de 1.077 g/ml; al determinar la densidad de los espermatozoides que flotaron después del periodo de centrifugación, encontró que ésta fue de 1.0715 g/ml [5]. Para realizar esta estimación, el investigador tomó en consideración que la masa de los cromosomas en la cabeza del espermatozoide ocupa el 80% del total de la célula y que el 20% restante lo representa la pieza media y la cola; además asumieron que la forma individual en un cromosoma es cilíndrica, midiendo también la longitud y el diámetro de los cuatro ejes de los cromosomas [8]. De esta forma se calculó que la densidad total de los espermatozoides enriquecidos fue de 1.0715 g/ml, mientras que la de los cromosomas fue de 1.08275 g/ml y para el resto de la célula espermática de 1.0265 g/ml. Con estos datos determinaron que los espermatozoides portadores del cromosoma Y tenían una densidad de 1.07132 g/ml mientras que el espermatozoide con cromosoma X de 1.0715 g/ml [5].

El uso de la centrifugación se ha utilizado cotidianamente para la separación de partículas de diferente densidad [9], sin embargo, la técnica ha sido abandonada para la separación de las poblaciones espermáticas X y Y, debido a que su uso no ha podido ser generalizado,

principalmente por la baja confianza en la validación de la misma, por lo que los resultados obtenidos son cuestionados por los métodos de validación empleados [2].

No obstante, con la finalidad de obtener una metodología que pueda ser accesible y de bajo costo, recientemente la técnica de centrifugación en gradiente de densidad, utilizando Ficoll y diatrizoato de sodio fue retomada en la especie bovina para la separación de espermatozoides portadores del cromosoma X y Y, reportándose el 80% de enriquecimiento de espermatozoides X, validado por PCR-tr [2]. Sin embargo, al utilizar la misma técnica implementada por Vázquez para separar a los espermatozoides de ovino, [10] obtuvo 50% de crías machos y 50% de crías hembras al nacimiento; sugiriendo que era necesario modificar la técnica para su empleo en los espermatozoides de ovino, proponiendo varias alternativas, como reducir el tiempo de centrifugación a 15 minutos, mediante la disminución del número de gravedades (x g) o disminuyendo la concentración de espermatozoides a ser separados, para con ello posiblemente permitir una mejor separación de los espermatozoides X.

Rojas, al utilizar la técnica de centrifugación en gradiente de densidad, para el sexado de semen de borrego centrifugando solo por 15 minutos, como fue propuesto por López, logró el enriquecimiento del 68% de espermatozoides X, validando por citometría de flujo e inseminación artificial [11]. Adicionalmente, este mismo autor, al modificar otras variables, como la concentración espermática (utilizando 160 y 80 $\times 10^6$ espermatozoides/ ml), el número de gravedades (567 x g, 252 x g) y volumen del gradiente (8 y 15 ml), consigue el 74% de enriquecimiento de espermatozoides Y en esta misma especie también valorando por citometría de flujo (datos no publicados).

Se sabe que la tecnología del sexado de semen por citometría de flujo parece ser una de las técnicas más eficientes para la separación de espermatozoides X y Y [12]. Sin embargo, a pesar de su aplicación en un gran número de especies [13] ésta presenta desventajas como el bajo número de espermatozoides viables obtenidos después del proceso [12]; lo que ocasiona disminución de los parámetros de fertilidad o la necesidad de contar con personal altamente capacitado, generando un elevado precio por las células sexadas para con ello compensar los costos de producción [14, 15].

Se ha señalado que en el proceso de sexado por citometría de flujo el deterioro generado sobre la célula espermática, como la fragmentación del DNA [16], la capacitación prematura, disminución de la motilidad, daño a la integridad acrosomal entre otros [17], posiblemente se debe al uso del fluorocromo, la temperatura de re-incubación, o la exposición a los rayos láser [16, 18]. A la fecha, se ha intentado disminuir estos efectos a través de adición de antioxidantes [19], la utilización de soluciones amortiguadoras específicas como Androhep®, Talp® [20], la adición del plasma seminal [21]. Sin embargo, no se ha encontrado todavía un protocolo eficaz que contrarreste los efectos generados por el sexado de semen con ésta técnica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antecedentes

Desde la antigüedad, el hombre ha tenido una fascinación por la selección del sexo y se han formado a lo largo del tiempo diversas teorías sobre ello [22]. Por ejemplo, desde tiempos muy remotos se menciona en la biblia, en el libro de Génesis (2:21) “y Dios creó a Eva”, la primera mujer creada de una costilla de Adán, esta declaración se ha convertido en parte popular y de influencia en muchas culturas para la selección del sexo [23]. En la cultura griega, la idea de que los machos eran más calientes que las hembras es atribuido al filósofo Empédocles, quién postuló que los organismos son hechos de cuatro elementos: fuego (caliente), aire (húmedo), agua (frío) y tierra (seco) [24]. Esta relación fue usada por Aristóteles como base para la teoría de la determinación del sexo; esto es, que los machos tenían un elemento el fuego como elemento abundante y superior, mientras las hembras tenían como elemento el agua y por lo tanto, era fría [23, 24]. Así el ímpetu del macho y la frialdad de la hembra determinaron su respectivo rol en la reproducción [23]. También, el sexo de la cría se relacionó con su localización, es decir, el lado derecho es más caliente que el izquierdo y por lo tanto se asociaba con el macho (derecha) y la hembra (izquierda) [24]. De acuerdo con Parménides, el sexo en el embrión era determinado por la posición de éste en el útero, los machos se posicionaban en el lado derecho y las hembras en el lado izquierdo de éste. Mientras que Anaxágoras pensó que el sexo lo determinaba el padre, para los machos el semen se formaba a la derecha del testículo y para las hembras del lado izquierdo. Aunque Aristóteles criticó ambas teorías, él tenía evidencia para decir que los fetos con distintos sexos podrían estar alojados en el mismo lado del útero y que los

hombres con un solo testículo podrían ser padres de hijos tanto machos como hembras. A pesar de ello, la determinación del sexo “izquierda/derecha” permaneció por cerca de 2,000 años [23].

No fue hasta 1676, que la teoría de la determinación del sexo venció un obstáculo, cuando Antonie Van Leewenhoek envió una carta a *The Royal Society of London* describiendo e ilustrando a un “animaculo” en el hombre y el perro. Así esta misteriosa sustancia, el semen, se convirtió en objeto de estudio, descubriéndose el origen, estructura y función de estos “pequeños animalitos” [25]; descritos en un inicio como artefactos o “gusanos con cola”, la idea de que estos “animaculos” tenían una participación en la determinación del sexo, contradecía a las teorías antiguas. Pero esta idea fue aceptada y más aún que estos animalitos originaban a los huevos [23].

Posteriormente, Willian Harved postuló que todos los animales, incluso vivíparos, más aún el hombre, están todos engendrados a partir de un huevo y así rápidamente se popularizó ésta idea [25].

En 1857, Karl Van Boer, descubrió a los “animaculos” como parásitos y les dio el nombre de “espermatozoides” [25]. La palabra espermatozoide proviene del latín σπέρμα (esperma, semilla) palabra a su vez compuesta de la raíz σπερ- (sembrar, inseminar) y el sufijo -μα/-ματο (medio, instrumento o resultado), de ζωον (zoo, animal, ser vivo) y εϊός (-iode, aspecto o apariencia de). “que parece un ser vivo, que es medio de inseminación” [26].

El enigma del espermatozoide fue resuelto por Albert Kölliker, quién examinó a animales invertebrados de vida marina sobre el microscopio y concluyó que los espermatozoides no

son animales independientes, sino producto de las células en el testículo y necesitan tener contacto con los huevos para tener una reproducción exitosa. La unión de estas dos células nucleadas fue observada 30 años después [23].

Determinación sexual en mamíferos

La determinación del sexo es establecida por diversos mecanismos [22] en los mamíferos, primeramente se lleva a cabo en el momento de la fertilización; las hembras poseen una constitución cromosómica XX, mientras que los machos XY. Durante la vida fetal se establece el sexo gonadal, donde la cresta gonadal indiferenciada en las hembras se diferenciará como ovario y en los machos como testículo [27].

La determinación sexual involucra procesos moleculares que establecen vías alternas de expresión de genes previos a la diferenciación morfológica de la gónada embrionaria. Si bien en los mamíferos placentarios la “determinación sexual génica” ocurre al fusionarse los pronúcleos masculino y el femenino formando el núcleo del cigoto, la “determinación sexual gonadal” está influenciada por el establecimiento de vías dimórficas de expresión génica conducentes a la diferenciación de ovarios y testículos. La “diferenciación sexual somática” se refiere a la diferenciación sexual de los conductos de Wolff, Müller y el seno urogenital que son los precursores embrionarios de los tractos genitales externos, respectivamente. Además, participan mecanismos neuroendocrinos conducentes a la expresión de las características sexuales secundarias postnatales y el establecimiento de un

patrón dimórfico de comportamiento sexual, que completan el complejo proceso de diferenciación sexual de un individuo [27].

En el caso de los mamíferos, el cromosoma Y contiene el gen Sry (del inglés sex determining región Y) [22], la cual actúa como un gen maestro que a manera de “switch” inicia la determinación del testículo desencadenando la vía de expresión de diversos genes involucrados en el proceso de la determinación sexual, por ello es considerado el factor determinante del testículo (FDT/fdt). Ahora bien, en términos celulares, el gen Sry se ha relacionado con la diferenciación de las células de sertoli, con la migración de las células del mesonefros a las crestas genitales y con la proliferación de las células en las crestas genitales. Para la determinación del ovario, se consideró que este proceso se daba por la simple ausencia (default) de un factor determinante del testículo (FDT), después identificado como el gen SRY/ sry. No obstante se ha postulado, un factor determinante del ovario (Od) el cual se encargaría de dirigir la formación del ovario es decir, “un organizador ovárico” [27].

Métodos para la separación de espermatozoides

La idea del control sobre el sexo en un individuo ha mantenido a la humanidad interesada desde hace siglos [28]. Como se sabe, el cromosoma X dependiendo de la especie, es entre 2.9 y 4.2% más largo que el cromosoma Y y tiene una diferencia de densidad alrededor de 0.0007 g/cm^3 por lo tanto, esto hace que su separación sea posible [28]. Por tanto, diversos

métodos se han establecido para llevar a cabo la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X y Y.

Diversas técnicas han sido consideradas para seleccionar entre el espermatozoide X y Y, basadas en las diferencias que existen entre ambos espermatozoides, por ejemplo los efectos del pH tanto seminal y vaginal, lo cual actúan en favor de un sexo en particular [29]; otro método es la diferencia de cargas eléctricas, demostrándose que en los espermatozoides de humano y conejo la movilidad electroforética es mayor el espermatozoide X que el espermatozoide con cromosoma Y [30]. Settles en 1960, identificó dos tipos morfológicos de espermatozoides por medio de la coloración Feulgen y análisis de microscopía óptica, donde el espermatozoide X es de mayor tamaño y con la cabeza ovalada y el espermatozoide Y es de menor tamaño y con la cabeza redondeada [29].

Otra técnica propuesta, es la diferencia en la velocidad de sedimentación basado en la diferencia de peso y tamaño de los espermatozoides X y Y, mostrando que ambos espermatozoides difieren en la velocidad de sedimentación dependiendo del medio utilizado, esto tomando en consideración que el espermatozoide Y es más ligero y pequeño que el espermatozoide X [31]. Por otro lado, la tinción de quinaquina fue utilizada en el espermatozoide de humano para identificar el cuerpo F del cromosoma Y [32] y así favorecer a un sexo en particular. Ahora bien, el uso de las columnas de Sephadex para la separación espermática también fue utilizada [33]; el empleo de un método inmunológico fue planteado a través del antígeno de histocompatibilidad (H-Y) que se encuentra sobre la superficie de las células del macho, pero no de la hembra [34]. La velocidad de nado

(swim up) fue reportado por Ericsson, considerando la posibilidad de seleccionar el sexo basado en la motilidad progresiva, siendo el espermatozoide Y más veloz que el espermatozoide X [31].

Otra técnica, quizás la más utilizada es la separación por gradientes de densidad donde se basa en la diferencia de densidad que existe entre las dos poblaciones de espermatozoides [4], siendo el espermatozoide Y más ligero que el espermatozoide X, además el espermatozoide con cromosoma X contiene más DNA y proteína nuclear que los espermatozoides Y siendo esta proporcional a la diferencia de masa entre los dos tipos celulares [29].

Por otro lado, la diferencia en el contenido de DNA, permite la cuantificación de la proporción de espermatozoides X y Y y hoy en día, la citometría de flujo es la técnica usada para el sexado de semen, la cual mide el grado relativo de fluorescencia que emite cada célula al ser teñida con fluorocromos, en el caso de los espermatozoides X y Y, las células son teñidas con fluorocromos específicos para DNA y para distinguir la diferencia en el contenido de cromatina en los dos genotipos [4]. La valoración de los cromosomas depende de la especie examinada, ya que los cromosomas X contienen entre 0.5% y 10% más contenido de DNA que es el cromosoma Y [35].

Otras metodologías han sido propuestas en la actualidad para la selección de un sexo en particular, como la colección y transferencia de embriones para su sexado [36], basada en el uso de la ingeniería genética (DNA recombinante) para la identificación de fragmentos específicos de DNA en los cromosomas del embrión y el procedimiento del sexado consiste

en coleccionar varios blastómeros del embrión (6 a 7 días de edad) y localizando en éstas células, secuencias de DNA específicas del cromosoma Y el cual se puede emplear PCR para amplificar la muestra de ADN obtenida del embrión [37] o bien, una Reacción de Amplificación Isotermal Mediada (LAMP), la cual consiste en la amplificación de DNA específico bajo condiciones isotermas (60-65°C) empleando cuatro primers específicos que reconocen seis distintas secuencias de DNA diana [38], por otro lado, la Hibridación *in situ* (FISH) [39] consiste en colocar una sonda específica de ADN marcada con isótopos radioactivos para detectar las secuencias específicas de ADN presentes en el cromosoma Y [37] o la inyección espermática intra-citoplasmática (ICSI) la cual consiste en introducir un espermatozoide en el citoplasma de un ovocito con ayuda de una micropipeta [36].

Centrifugación en gradientes de densidad como técnica de separación

La idea surge en 1925 por el Dr. Lush quién propone que las diferencias físicas en el espermatozoide como: la motilidad y la diferencia de tamaño en los espermatozoides X y Y hacen posible la separación; así pequeñas variaciones en la motilidad son capaces de generar menos resistencia a través de un líquido, lo que posiblemente explique la mayor proporción de nacimientos de machos en las distintas especies animales. Mientras que la separación por tamaño de los espermatozoides inmersos en un líquido, con una densidad casi cercana a la densidad de los mismos, puede ser lograda al someter a éstos a una fuerza centrífuga; con esta premisa, se realiza el primer gradiente de densidad para la separación

de espermatozoides de conejo, utilizando fluidos de ovario y secreciones de glándulas accesorias, validando la técnica por inseminación artificial [7].

Posteriormente, Harvey en 1946 basado en los experimentos de Lush, empleando espermatozoides de humano, realiza una serie de cálculos para determinar la densidad de los espermatozoides, asumiendo que la masa de los cromosomas en la cabeza del espermatozoide es aproximadamente el 80% y el resto (cola, pieza media) el 20% por lo tanto, determinó que la densidad del espermatozoide con cromosoma Y es de 1.07132 g/ml y para el espermatozoide portador el cromosoma X de 1.0715 g/ml. Una vez determinada la densidad, utilizó una suspensión de Dextrina en solución Ringer, obteniendo la separación de espermatozoides X de humano en el botón del tubo y espermatozoides Y por encima de este [5].

En 1977, Hegde utiliza Ficoll al 8% y metrizoato al 33%, con una densidad final de 1.08 g/ml, centrifugando a 100 x g durante 20 minutos, logrando un enriquecimiento del 62.9% de espermatozoides Y de humano, siendo estadísticamente significativo [40].

Durante 1982, se estimó la diferencia en el contenido de DNA entre los espermatozoides X y Y de bovino, obteniendo una diferencia de densidad del espermatozoide Y de 7×10^2 g/cm³ o 0.06% en relación al espermatozoide X [4]. Por otra parte, Kaneko, al utilizar un gradiente de Percoll con densidades de 1.06, 1.07, 1.08, 1.09, 1.10, 1.11 g/ml para separar espermatozoides de humano, centrifugando a 250 x g durante 20 minutos, obtiene 73% de espermatozoides Y en la parte superior del tubo y 27.4% de enriquecimiento de espermatozoides X, validando la técnica por la presencia del cuerpo F [41].

Posteriormente, Lizuka y Kaneko observaron, que cuando los espermatozoides de humano son colocados en una solución con 76.7% de Percoll y ultracentrifugando a $30\ 000 \times g$ durante 20 minutos, la velocidad del espermatozoide X es mayor que la del espermatozoide Y; considerando que la facilidad del pasaje de los espermatozoides afecta su velocidad de sedimentación, evaluaron un gradiente discontinuo de 12 fracciones con diferentes concentraciones de Percoll (del 25 al 80%) con la intención de separar a los espermatozoides X, centrifugando a $250 \times g$ por 30 minutos, obteniendo mejores resultados, donde los espermatozoides del sedimento contenían un 6.4% de espermatozoides Y mientras que para los espermatozoides X el 94%, reportando que más del 90% de los espermatozoides mantuvieron su motilidad después del tratamiento [42].

Schwiderski [43], utilizando espermatozoides de bovino y una metodología semejante a Kaneko y Lizuka (1987), obtuvo un enriquecimiento del 74.8% de espermatozoides X, para ello utilizó densidades entre 1.034 g/ml a 1.068 g/ml, centrifugando $500 \times g$ durante 10 minutos; esta técnica fue verificada por medio de hibridación *in situ* [44]. Para 1993, Blottner realiza algunas modificaciones de la metodología de Schwiderski y validando por inseminación artificial, obtuvo 75% y 90% de embriones de sexo masculino y femenino, respectivamente, en la especie bovina [4].

Después, Hossepian de Lima utilizando un gradiente de Percoll con densidades de 1.004 g/ml a 1.123 g/ml, obtuvo 75% de enriquecimiento de espermatozoides X en la especie bovina, mostrando 80% de motilidad, los cuales fueron utilizados para la producción de embriones *in vitro* obteniendo 75% de ovocitos fecundados de los cuales el 30% se desarrollaron en blastocisto [45].

Vázquez al emplear un gradiente de densidad en Ficoll-diatrizoato de sodio, utilizando semen de bovino y centrifugando a $567 \times g$ durante 20 minutos; reporta un 80% de enriquecimiento de espermatozoides X, esto validado por PCR-Tr [2], mientras que López, utilizando la técnica de Vázquez pero usando semen de ovino y basándose en el sexo de las crías, obtiene un 50% de machos y 50% de hembras, concluyendo que la técnica de centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio no permitió enriquecer las poblaciones de espermatozoides en la especie ovina, contrario a lo que reportó Vázquez con espermatozoides de bovino [10]. Sugiriéndose entonces el realizar modificaciones, entre éstas el uso de una menor concentración de espermatozoides, utilizar un menor tiempo de centrifugación e incrementar la densidad del gradiente. Adicionalmente, Chávez evaluó la viabilidad de los espermatozoides de bovino al descongelado, empleando la metodología de Vázquez, reportando 80.5% y 72.71% antes y después de la congelación respectivamente, concluyendo que este método permite obtener porcentajes de viabilidad aceptables para el posible uso del semen descongelado en la inseminación artificial [46]. Rojas al retomar la metodología descrita por López, considerando la propuesta de la modificación del tiempo de centrifugación y empleando la misma especie, obtiene un 60% de hembras al nacimiento, lo cual también fue evaluada por citometría de flujo, coincidiendo con el porcentaje anterior el enriquecimiento de la población de espermatozoides X [11]. Por lo tanto, la técnica de centrifugación en gradiente de densidad tiende a producir el enriquecimiento de las poblaciones espermáticas pero es indispensable continuar estandarizando la técnica, para lograr un enriquecimiento mayor y considerar la valoración de la criopreservación del semen utilizando esta técnica.

Ficoll y diatrizoato como medio para generar un gradiente

El Ficoll 400 es un polímero sintético de sacarosa y epiclrorhidrina, cuyo peso molecular es de 400, 000 Daltons, siendo un compuesto soluble en agua; el diatrizoato 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%) contienen una osmolaridad 280 a 308 mOsm y una densidad final de 1.077 ± 0.001 g/ ml, siendo utilizado principalmente para la separación de componentes sanguíneos [47].

Una de las consideraciones a tener en mente cuando se emplea este tipo de gradiente de densidad, es que la cantidad de células a procesar debe guardar una proporción con el volumen y la altura del medio de separación; así el aumentar la altura del estrato celular, con respecto a la altura del medio, aumentará la contaminación en la interface. 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 del medio y de las células [47].

Citometría de flujo en el sexado de semen

La citometría de flujo es una técnica cuantitativa simple de análisis celular, ésta fue desarrollada en los 70's y rápidamente comenzó a ser un instrumento esencial para las ciencias biológicas, esto gracias al desarrollo de la ciencia computacional , la tecnología del

láser, la producción de anticuerpos monoclonales, la citoquímica y la química de los fluorocromos [48]. La mayoría de la aplicación clínica en citometría de flujo, está enfocada hacia el diagnóstico de patologías hematopoyéticas [48], pero contiene una variedad de aplicaciones en otros campos, como es la industria agropecuaria en Medicina Veterinaria. Por ejemplo, el sexado de semen, fue desarrollado en el Lawrence Livermore National Laboratory por el Dr. Pinkel, 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 [49]. Esta tecnología fue tiempo después implementada por USDA Beltsville Agricultural Reserch Center para su aplicación en la ganadería [50].

Ahora bien, el principio del sexado por citometría de flujo se basa en que los espermatozoides X tienen más contenido de DNA que los espermatozoides Y (en el caso del bovino 3.8% y el ovino 4.2%, humano 2.8%) [13] y aunque la diferencia es pequeña, es posible medir el contenido de DNA de un espermatozoide y distinguir con suficiente precisión (90% de confianza) entre el cromosoma X y Y. Sin embargo, alrededor de la mitad de los espermatozoides serán descartados como insexables, habiendo un rango del 10% de error para los espermatozoides sexados bajo este proceso [16]. Para valorar, el contenido de DNA en el espermatozoide se recurre principalmente al uso del colorante fluorescente Hoechst 33342 [51]; este es un disbenzimidazol que contiene 2 anillos consecutivos N-metil piperazina terminal y grupos fenólicos elongados, que puede penetrar la membrana de la célula espermática y unirse a las bases adenina-timina de la cadena de ADN estequiometricamente [52]. De esta manera, los espermatozoides con cromosoma X contienen entre un 3-4% más de colorante fluorescente unido al DNA que el

espermatozoides Y en general en todas las especies [29]. El fluorocromo es excitado a cierta longitud de onda (340 nm) y la fluorescencia emitida (510 nm) es medida por un detector y analizada por computadora [51].

Un método utilizado para detectar los espermatozoides muertos de los vivos es adicionar pigmento para alimentos a las muestras que van a ser separadas. Los espermatozoides que presentan la membrana dañada permiten la entrada de este colorante, mientras que los que se encuentran intactos la excluyen; la entrada del colorante apaga la fluorescencia de Hoechst 33342, por lo que los espermatozoides con una fluorescencia mal emitida son descartados en el proceso, lo que ha beneficiado al sexado de semen por citometría de flujo [53].

Entre los factores que limitan la eficiencia de esta técnica se destacan principalmente el bajo número de espermatozoides viables obtenidos [14], la larga duración de la coloración, la temperatura y la necesidad de utilizar semen fresco [54]. En la especie porcina, además de reducir la viabilidad y modificar el estado de las membrana [55], induce una reacción acrosomal parcial o cambios ligados a la capacitación [56]. En especies como el garañón y el toro genera una disminución de la motilidad progresiva y de la longevidad del espermatozoide al descongelado [55], mientras que en el caso del semen caprino origina disminución en su habilidad para penetrar a través del moco cervical [57]. Lo anterior posiblemente se deba a la susceptibilidad de los espermatozoides a la dilución y a la criopreservación, aunado a los factores estresantes durante el proceso de sexado, como cambios de temperatura y presión; de manera específica existen diferencias en la composición de la membrana plasmática entre especies o de interacción especie-específica

con los componentes del plasma seminal, o variación en el empaquetamiento del DNA, lo cierto es que aún se desconocen todos los aspectos involucrados en estas alteraciones [58].

Aplicaciones del sexado en la industria animal

Una de las mayores ventajas en la industria bovina ha sido la producción de animales de raza pura; principalmente hembras, ya que son un excelente reemplazo para producir carne de res y lácteos, además en promedio las vaquillas pesan alrededor de 2 kilos menos al nacimiento que los terneros, así la incidencia de distocia en vacas de primer parto puede disminuir con la aplicación de la técnica del sexado de semen [51].

Otra aplicación es obtener terneros de las mejores vacas en un hato y usarlos como crías de toros con alto valor genético, así como notoriamente incrementar el número de hembras en un hato para acrecentar la producción [51]. En especies en peligro de extinción, la utilización de esta técnica ha sido limitado, debido a que algunos ejemplares se encuentran lejos para ser incluirlos en un programa de reproducción [53], pero bien puede ser utilizada como una simple estrategia para mejorar la estructura social ligada a la dominancia por sexo en especies de vida libre o en cautiverio, así como en especies que su reproducción es lenta; esto podría ser benéfico cuando se combina este tipo de tecnología a través de una repoblación por la producción de un sexo en particular [59]. Además, la criopreservación y el sexado de espermatozoides junto con otras tecnologías asistidas (ART) pudieran facilitar la práctica y el manejo de la conservación de este tipo de especies [53].

Modelo ovino para el sexado

En la especie bovina, el sexado de semen es una tecnología que se ha tratado de convertir en parte integral de la Inseminación Artificial a través de su comercialización, como una transferencia de tecnología, por lo que ha sido utilizado en muchos programas de sincronización de celos en vaquillas [14], tanto así que se desarrolló un citómetro adaptado a las condiciones de los espermatozoides, lo que a su vez ha ocasionado nuevas demandas sobre el procesamiento del semen y sus distintos usos [60]. Así, en muchos países la industria bovina se encuentra en fase de madurez, donde el principal producto es el semen congelado pues se tiene un beneficio en el costo por este servicio; además ello ha permitido que el material genético sea compartido, teniéndose una amplia disponibilidad por catálogos de sementales [15]. De esta manera, la demanda de semen sexado en la industria bovina cada vez más solicitada debido a su rentabilidad ya que se ha buscado crear nuevas oportunidades en la inseminación artificial y tratando de no incrementar demasiado el costo de producción [15].

En el caso de la ovinocultura, aunque el manejo es diferente en diversos países, en su mayoría se apega a la industria bovina, mientras que para la genética equina se tienen ciertas dificultades debido a la época del año, la restricción de la raza sobre la inseminación artificial, entre otros factores [14].

Específicamente en la oveja, ésta ha sido una de las principales especies de interés como modelo para implementar el sexado de semen, debido a su pequeño tamaño, además comparado con diversos trabajos realizados en otros pequeños rumiantes, el ovino ha

resultado ser la excepción a la regla ya que existe la hipótesis de que los espermatozoides de carnero son de alguna forma más resistentes a el estrés generado por el proceso de sexado, por lo que muestran mejores resultados que otras especies [56, 60]. En el carnero, el proceso de sexado del semen tal parece que selecciona una subpoblación específica “superior” de espermatozoides, esto es lo que hace que se orienten mejor a través de la boquilla del citómetro, lo que discrimina mejor a los espermatozoides teñidos por el uso de pigmentos para alimentos, eliminándose así los espermatozoides con más anormalidades morfológicas y sin una membrana nuclear intacta. Por lo tanto, si el espermatozoide de carnero fuera en efecto más susceptible a los factores estresantes antes de la separación, tales como la tinción, incubación y dilución, es posible que la presión del equipo sobre el eyaculado original puede ser mayor para el de esta especie que para él de otras especies, explicándose así, la ligera ventaja en la función espermática después del sexado [56].

Los estudios con espermatozoides de carnero para su sexado muestran, *in vitro*, una calidad superior en supervivencia de las células en términos de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal, así como actividad mitocondrial, demostrando una mejor longevidad funcional pudiendo ser manipulados en el laboratorio; lo cual posiblemente sea representativo de una situación *in vivo* [61], sugestivo de que los espermatozoides de carnero sexados posiblemente tienen una vida media fertilizadora prolongada en el tracto reproductor de la hembra [17].

Lo cierto es que en la oveja hay una mayor demanda para esta tecnología, pero ha resultado relativamente costosa en relación al valor de los animales, pudiendo limitar esto, su adopción mediante la estandarización de técnicas de inseminación artificial [60].

Importancia de las mitocondrias en el espermatozoide

Las mitocondrias se localizan helicoidalmente alrededor de las fibras densas externas en la pieza media de la cola del espermatozoide y generalmente están acomodadas de extremo a extremo, aunque el número de hélices paralelas y de giros a lo largo de la pieza media varía entre especies [62].

La mitocondria es uno de los organelos más importantes para la evaluación de la calidad espermática y esto puede ser debido al hecho de que contiene su propio DNA y un potencial de membrana que puede ser fácilmente examinado *in vitro*. Actualmente, la evaluación como indicador de fertilidad entre la motilidad [63] y la integridad del DNA espermático a través de las mitocondrias, ha quedado bajo revisión y debate [64], ya que este organelo no solo participa en la producción de energía, también en la regulación del balance REDOX, la regulación osmótica y en la homeostasis del Ca^{2+} [65]. Sin embargo, además de la fosforilación oxidativa que se realiza en las mitocondrias, la glucólisis es también funcional en el espermatozoide [66].

Como se sabe, las mitocondrias están en tándem y unidas herméticamente por puentes disulfuro en la pieza media [67], estas contienen muchas proteínas y enzimas como citocromo c oxidasa, piruvato descarboxilasa y creatinina cinasa (CK), las cuales son isoformas específicas de estos organelos [68], postulándose que dichas isoformas pueden permitir a la célula espermática modular la función mitocondrial en la etapa de la fertilización, además muchas enzimas glicolíticas se encuentran distribuidas en la cola del

espermatozoide y algunas de esas isoformas contienen modificaciones pertinentes en su extremo N- terminal para ayudar a estar ancladas en la vaina fibrosa [69].

En la oveja se ha observado que la aplicación de la rotenona, reduce la fertilidad, por lo tanto la importancia de la respiración mitocondrial juega un papel transcendental en la penetración del espermatozoide al cérvix [70]; existiendo una relación directa entre la motilidad, respiración mitocondrial y la fertilidad, siendo este organelo considerado fundamental para la fisiología del espermatozoide [71].

Potencial de membrana mitocondrial

El potencial mitocondrial y el consumo de oxígeno depende de la actividad de la cadena de transporte de electrones y de la ATP sintetasa. Los cuatro complejos respiratorios (I-V) forman la cadena de transporte de electrones, la actividad de estos es alta cuando la motilidad aumenta en el espermatozoide [72].

El mantenimiento de las diferencias de cargas, a través de la membrana mitocondrial interna es un prerrequisito para que la mitocondria produzca el ATP [73], pero parte de éste último es consumido por el espermatozoide para mantener el gradiente de Na^+/K^+ a través de la membrana plasmática. La ATPasa de Na^+/K^+ participa también indirectamente en impulsar otros transportadores y por lo tanto, regula el gradiente químico y eléctrico sobre la membrana plasmática. La integridad funcional de la membrana mitocondrial espermática puede ser importante para la sobrevivencia de la célula en el tracto genital de la hembra o durante el uso de las Técnicas de Reproducción Asistida (ART) [74], así muchas

tinciones fluorescentes comerciales como el JC-1, y MitoTracker Red son extensamente usadas para examinar el potencial de membrana mitocondrial como indicador de la calidad espermática [66].

Los compuestos anteriores tienen como principio el fluorescer de color rojo cuando el gradiente de protones sobre la membrana mitocondrial interna (MMI) se encuentra presente; el gradiente de protones es el resultado del acarreo activo de electrones y su acoplamiento a la fosforilación oxidativa; los protones fluyen de nuevo a través de la ATP sintetasa a la matriz mitocondrial, lo cual es utilizado para la producción aeróbica de ATP. En las mitocondrias no teñidas, el gradiente de protones está colapsado y en consecuencia la producción de ATP se detuvo. Por lo tanto, un espermatozoide no teñido no contiene mitocondrias funcionales, mientras que células teñidas positivamente son aeróbicamente funcionales [75]. Adicionalmente, cuando el espermatozoide tiene totalmente fluorescente la pieza media o cuando ésta no presenta fluorescencia es indicador de la despolarización de la MMI siendo un evento orquestado a la vez sobre la totalidad de la pieza media [76].

Importancia del acrosoma espermático

El acrosoma es el único organelo presente en la cabeza del espermatozoide originado del complejo Golgi y contiene enzimas necesarias para que el espermatozoide penetre a través de las estructuras del ovocito para lograr la fertilización. Es una vesícula membranal cerrada que se asienta como un gorro sobre el núcleo en la parte anterior de la cabeza del

espermatozoide. Además, el acrosoma es altamente conservado a lo largo de la evolución y junto con el axonema es un sello distintivo del espermatozoide de muchos animales [62].

Durante la capacitación espermática varios eventos bioquímicos suceden sobre la membrana plasmática del espermatozoide, tales como la movilización de ciertas glicoproteínas periféricas, la remoción de factores decapacitantes, como el factor estabilizador del acrosoma e inhibidor de la acrosina, así como la distribución de otras proteínas que la integran [77]. Esos cambios son estrictamente necesarios para que se dé la unión del espermatozoide con el ovocito y la reacción acrosomal. Durante este proceso las enzimas hidrolíticas del acrosoma son liberadas por exocitosis para permitirle al espermatozoide penetrar la zona pelúcida [78]. Estos procesos fisiológicos están bien coordinados y pueden ocurrir en respuesta de inductores naturales [79]. En contraste, la pérdida del contenido acrosomal puede ocurrir cuando el rompimiento de las membranas se da por muerte celular, mostrándose cambios acrosomales similares al fisiológico [80], por lo que la evaluación de la integridad acrosomal es crucial para realizar una fertilización normal tanto *in vitro* como *in vivo* [77]. Un aumento del porcentaje anormal en la morfología de los acrosomas está relacionado con una falla en la fertilización, al emplear las ART como la fertilización convencional *in vitro* [81]. De esta manera, la evaluación del estado acrosomal ha sido usado como una prueba para valorar la función del espermatozoide, demostrando que puede ser útil no solo como herramienta en andrología con fines de investigación, sino para determinar la anticoncepción masculina en la especie humana [82].

Diversos métodos han sido descritos para evaluar el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, los cuales incluyen la triple tinción [83], la tinción de amarillo naftol/eritrosina B [84] y método enzimáticos entre otros. Sin embargo por diferentes razones estas técnicas no han sido ampliamente utilizadas [85]. En el espermatozoide de carnero, a menudo es difícil monitorear el estado acrosomal con un microscopio convencional de luz y por otra parte, el microscopio electrónico resulta poco práctico para las evaluaciones rutinarias. Pero actualmente se utilizan conjugados de lectinas fluorescentes, siendo esta una técnica específica y que ha sido utilizada para mejorar la visualización del acrosoma con microscopía de fluorescencia [86]. Las lectinas reconocen específicamente a residuos de carbohidratos [87] y unidas a diversos fluorocromos han sido utilizadas para evaluar la expresión, distribución y alteraciones de los glicoconjugados en la membrana del espermatozoide [88]. Las lectinas de cacahuete PNA (*Arachis hypogea*) se une específicamente a la membrana acrosomal externa, uniéndose a residuos de β -galactosa, fluoresciendo en la región acrosomal [89]; este tipo de lectinas presenta menos uniones específicas en otras áreas del espermatozoide [90]. La detección de la fluorescencia se hace en espermatozoides teñidos vivos y cuando se observa en el microscopio de fluorescencia el acrosoma del espermatozoide se observa una fluorescencia completa, lo cual es considerado como un espermatozoide con acrosoma intacto, si se observa el acrosoma con baja fluorescencia o parches o bandas en la región ecuatorial, esto indica signos de daño acrosomal o de la ocurrencia de la reacción acrosomal [91].

Por otro lado, se ha observado que la criopreservación puede causar un daño funcional permanente (daño subletal) y que reduce la habilidad de fertilización en el espermatozoide;

la cual está relacionada con la discapacidad de la función espermática, explicada en parte por la reducción del porcentaje de acrosomas intactos, aunque el daño acrosomal puede ser secundario a una muerte celular y al aumento en el número de espermatozoides viables con reacción acrosomal. Por lo tanto, una evaluación adecuada del estado acrosomal en espermatozoides congelados debe incluir el monitoreo de la viabilidad espermática [92]. Adicionalmente, cambios en la función del espermatozoide descongelado, puede ser debido al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar una peroxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana acrosomal, disminuyendo así la respuesta a las señales de entrada de calcio que disparan la reacción acrosomal [93].

Daño espermático por congelación

La criopreservación del semen es una de las más importantes tecnologías biológicas disponible para la industria animal, ya que permite el almacenamiento de las células espermáticas a largo plazo y una disseminación eficiente de una genética superior [94], lo que aunado a la inseminación artificial ofrece muchas ventajas para la industria ganadera, particularmente en la conjunción con la evaluación genética y el empleo de programas reproductivos [95]. Sin embargo, el más grande obstáculo para la explotación del semen criopreservado de muchas especies [96] es el enfriado, la congelación y descongelación ya que generalmente causa un daño a estructuras de membrana dando lugar a pocos espermatozoides viables y una disminución en la motilidad al descongelado. En

consecuencia, la fertilidad después de la IA es más pobre comparada con la utilización de semen fresco en muchas especies animales [97].

Se ha observado que al realizar el congelado-descongelado de espermatozoides se generan cambios en el espermatozoide ligados a la capacitación [98], reducción en la integridad de la membrana plasmática y en la membrana del acrosoma [99], reduciendo la heterogenicidad de la población espermática (Ollero, 1998) a través de la disminución de la motilidad y la habilidad para penetrar el moco cervical *in vitro* [100]. Particularmente, en los espermatozoides de carnero, la investigación se ha centrado en la composición de los diluyentes, en tasas de enfriamiento y dilución, así como el uso de aditivos para proteger el espermatozoide durante el congelado y descongelado [99].

Por otro lado, cuando se combina esta tecnología del congelado con el proceso de sexado, sabiendo que el espermatozoide viene de una combinación de factores que le generan estrés y por lo tanto reduce su vida media, el resultado es la alteración o distribución de ciertas proteínas en la membrana del espermatozoide generando a su vez motilidades ligeramente bajas al descongelado, entre un 30-35%, con un 40% de acrosomas intactos [101]; además el número de dosis de semen sexado criopreservado usado para la inseminación artificial va desde 1×10^6 hasta 6×10^6 espermatozoides/ pajilla, mientras que las dosis normales o sin sexar usadas para la inseminación van de $10-20 \times 10^6$ espermatozoides/ pajilla en el caso del bovino, pero la concentración depende de la especie animal a utilizar [102], en el caso del ovino, se han utilizado dosis de 1 y 5×10^6 espermatozoides [103].

También, se han detectado cambios ultraestructurales en el espermatozoide de bovino, causados por el proceso de sexado y la descongelación, describiendo que en la piza media las mitocondrias presentan perturbaciones en el arreglo helicoidal de las mismas, así como cambio en el volumen y una ligera condensación de la matriz [104]; lo cual coincide con lo observado por Simpson (1986) quien encontró en el carnero, que el enfriado rápido del espermatozoide puede generar la condensación de las mitocondrias, con la consiguiente reducción en la motilidad [105] Por su parte, Salamon (2000) menciona que en esta misma especie, los daños por el proceso de congelación-descongelación son más severos sobre la vaina mitocondrial y que dichas alteraciones pueden contribuir a la reducción de la motilidad, viabilidad y habilidad fertilizadora de la célula (Salamon and Maxwell 2000).

Lo cierto es que el nacimiento de corderos o de becerros seleccionando de un sexo en particular, se han producido utilizando la fertilización *in vitro* (IVF), empleando ovocitos y semen congelado-descongelado, semen sexado re-congelado-descongelado expandiendo enormemente la posibilidad de utilizar actualmente espermatozoides criopreservados en programas de sexado. Sin embargo, la eficiencia de este proceso es limitado pero podría ser ampliarse si se combina con el uso del sexado de semen [13].

JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento se ha reportado el nacimiento de crías en diferentes especies utilizando semen sexado por citometría de flujo, obteniendo un alto grado de pureza en sus poblaciones, pero resulta ser poco eficiente, ya que presenta ciertas desventajas, como el bajo número de espermatozoides viables obtenidos, además de representar un aumento en el costo de producción, dejándose de lado la búsqueda de otras metodologías que permitan reducir el costo y ser eficientes para poder obtener un buen número de espermatozoides viables y con capacidad fertilizadora, además de ser de fácil acceso.

El uso de la centrifugación en gradientes de densidad como método de sexado, ha mostrado que puede permitir el enriquecimiento de espermatozoides tanto X como Y, además de ser un método suave con las células, fácil de realizar y que permite recuperar un número mayor de espermatozoides sexados viables. Por lo tanto, puede ser una alternativa para el sexado de semen, pero debido a los métodos de validación empleados, ha sido dejado de lado.

Por otra parte, el uso del borrego como animal de estudio para el sexado de semen, ha mostrado muchas ventajas, además de ser una especie pequeña, fácil de maniobrar y que permite manejar un número considerable de células espermáticas; lo que ha brindado facilidades en el manejo de esta especie en este tipo de técnicas siendo una industria en vías de desarrollo.

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue utilizar la técnica de centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio para obtener un mayor porcentaje de espermatozoides X y evaluar el enriquecimiento de la población de espermatozoides Y de

semen ovino, utilizando la citometría de flujo como técnica de validación, además de evaluar la congelación de dichas células y valorar el potencial fertilizante de las mismas al descongelado.

OBJETIVO GENERAL

- Enriquecer la población de espermatozoides X ó Y del semen ovino por la técnica de centrifugación en Ficoll-diatrizoato de sodio y evaluar su potencial fertilizante *in vivo* en los espermatozoides criopreservados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener el enriquecimiento de la población de espermatozoides X ó Y de ovino mayor al 80% por medio de la técnica de centrifugación en Ficoll-diatrizoato de sodio, para su posterior criopreservación.
- Evaluar la viabilidad espermática, integridad acrosomal y función mitocondrial de las muestras obtenidas antes y después de utilizar la técnica de centrifugación en gradiente de densidad.
- Valorar el enriquecimiento de las poblaciones obtenidas por medio de la técnica de centrifugación en gradiente de densidad a través de la citometría de flujo.
- Evaluar la viabilidad espermática, integridad acrosomal y función mitocondrial antes y después de la congelación de la población obtenida por la técnica de centrifugación en gradiente de densidad.
- Evaluar la motilidad espermática en las células descongeladas sexadas de ovino.

HIPÓTESIS

La técnica de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio permitirá lograr el enriquecimiento de las poblaciones X ó Y y obtener espermatozoides viables y motiles al descongelado de semen ovino.

MATERIAL Y MÉTODOS

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 Laboratorio de Investigación del Departamento de Morfología, ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina y Zootecnia de la UNAM.

Animales de estudio

Se utilizaron 6 machos de fertilidad probada, 3 de raza suffolk y 3 de raza dorset, con edades de entre 2 y 5 años. Los machos fueron colectados con una vagina artificial (IMV) y con previa limpieza del pene y prepucio, se colectaron un promedio de dos eyaculados por por muestra, colectando 4 eyaculados de cada macho para obtener un total de 26 muestras. El periodo en que se colectó los eyaculados fue en el mes de diciembre 2012 al mes de febrero del 2013.

Transporte de la muestra al laboratorio

Una vez colectada la muestra, se realizó una dilución 1:9 utilizando TRIS modificado (300 mM hidroximetilaminometano, 27.8 mM fructuosa, 27.8 mM ácido cítrico, 0.05 ml de gentamicina, pH de 7.4) a una temperatura de 37°C, colocando papel parafina en la rosca del tubo para evitar derrames. Enseguida se colocó la muestra en un termo sobre una cama de agua y un refrigerante en gel a la misma temperatura (37°C), para poder ser transportado al Departamento de Morfología FMVZ-UNAM.

Valoración y evaluación de la muestra

Al llegar la muestra al Departamento de Morfología, se tomó la temperatura de la cama de agua y se evaluó la motilidad progresiva, esto se realizó con una gota de semen fresco, colocándola en una laminilla pre-calentada a 35°C y enseguida se depositó un cubreobjetos para ser evaluada la muestra al microscopio de luz (Leica DM 500,40x). Para dicha evaluación se asignaron valores del 0 al 100%, correspondiendo el valor 0 a las muestras sin movimiento y valores cercanos al 100% a las muestras con todos los espermatozoides con avance en línea recta [106]. Posteriormente la muestra se colocó en un tubo de ensaye de 15 ml para ser centrifugado a 2600 \times g por 3 minutos con la finalidad de decantar el medio de transporte. Enseguida la pastilla se resuspendió en 5 ml de PBS (137 mM de cloruro de sodio, 2.7 mM de cloruro de potasio, 7.6 mM de fosfato de potasio y 1.4 mM de fosfato de sodio dibásico, pH de 7.4) a una temperatura de 25°C, posteriormente al tubo

conteniendo la muestra fue recubierto con papel aluminio que ayudó como aislante para evitar cambios bruscos de temperatura.

Viabilidad espermática

De las muestras previamente re-suspendidas en PBS, se realizó una dilución 1:100, para la cual se homogenizó y se tomaron 2µL de la muestra para ser colocados en un tubo de microcentrifuga (tipo eppendorf) y se adicionaron 198µL de PBS, se homogenizó por agitación y se tomaron 20µL los cuales fueron colocados en otro tubo de microcentrifuga y se adicionaron 20µL de azul Tripán al 0.4% (0.08 g, 20 ml de PBS); se tomaron 10µl para ser colocados en hemocitómetro (cámara de Neubauer) e inmediatamente se realizó el conteo de espermatozoides: teñidos de azul o parcialmente teñidos, se consideraron espermatozoides muertos, mientras que los espermatozoides no teñidos o transparentes se consideraron espermatozoides vivos [107]. Para determinar la proporción de espermatozoides vivos y muertos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de células viables} = \left[\frac{\text{número de células contadas viables}}{\text{número de células contadas viables} + \text{número de células contadas no viables}} \right] * 100$$

Concentración espermática

La concentración espermática se determinó tomando 25µL de semen, colocándolos en un tubo de microcentrifuga y adicionando 500µL de solución Tritón al 0.1% (1ml de tritón en

999ml de PBS), enseguida se homogeneizó para posteriormente tomar 10 μ L y colocarlos en la cámara de Neubauer. Se contaron los cuadrantes de las esquinas y el central (5 cuadrantes), considerando solo los espermatozoides que se encontraron dentro del cuadro a contabilizar.

Para determinar la concentración espermática se utilizó la siguiente fórmula: [108].

Factor de dilución (21) X No. de células contadas en los 5 cuadrantes del hemocitómetro X la dimensión de la cámara (10,000) X 5 (número de cuadrantes contabilizados) = número de espermatozoides 10⁶

Generación de los gradientes de densidad utilizando Ficoll-diatrizoato de sodio

Para realizar el gradiente de densidad, se mezcló en un vaso de precipitados 1.536g de Ficoll y 26.11 ml de agua desionizada (Merk, Millipore) para obtener una solución al 8% (PM 400 Sigma-Aldrich, México). Por otro lado, se mezcló 2.624g de diatrizoato de sodio en 10.88 ml de agua desionizada (Merk, Millipore) para formar una solución al 32.8% de diatrizoato de sodio (Sigma-Aldrich, México). Ambas soluciones se mezclaron para formar la solución madre con una densidad aparente de 1.077 g/ml.

El gradiente de densidad discontinuo para la separación de los espermatozoides X y Y se preparó con la solución madre, elaborando una solución con densidad de 1.070 g/ml, utilizando 12.22 ml de la solución madre y 0.08 ml de agua desionizada. Para la preparación de una solución con densidad de 1.071 g/ml, se tomaron 12.23 ml de la solución madre y se adicionaron 0.07 ml de agua desionizada. Finalmente para generar la

densidad de 1.072 g/ml, se tomaron 12.24 ml de la solución madre y se adicionaron 0.06 ml de agua desionizada.

Todas las soluciones a las diferentes densidades fueron almacenadas en tubos falcón de 15 ml y mantenidas a -20°C para su almacenamiento, para su uso se colocaron 24 horas antes en el refrigerador (4°C) para su descongelación, después se colocaron 4 horas a temperatura ambiente para poder ser utilizadas.

Para montar los gradientes se utilizaron 8 tubos de ensayo de 10 mL con diámetro de 1 cm y a cada uno se les adicionó 1.5 ml de cada una de las soluciones con las densidades preparadas anteriormente, colocándolas de mayor a menor densidad (Figura 1). Posteriormente se depositó delicadamente 1mL de espermatozoides previamente resuspendidos en PBS a una concentración de 160×10^6 espermatozoides /ml sobre el gradiente de densidad. Se centrifugó a $567 \times g$ por 15 minutos utilizando una centrifuga con rotores de columpio (Hermle, Z300). Después de la centrifugación, se generaron cinco fracciones; las cuales fueron clasificadas como: fracción superior, anillo, intermedio 1, intermedio 2 y pastilla (figura 1), las cuales se recuperan con ayuda de una micropipeta y se colocaron en tubos de ensaye de 15 ml por separado, hasta coleccionar 10 ml de cada una de ellas. Las fracciones separadas fueron centrifugadas a $2600 \times g$ por 5 minutos con el fin de retirar los residuos del gradiente. La pastilla que se formó en cada fracción fue resuspendida en 2 ml de PBS y enseguida se determinó la viabilidad y concentración espermática como se describió anteriormente.

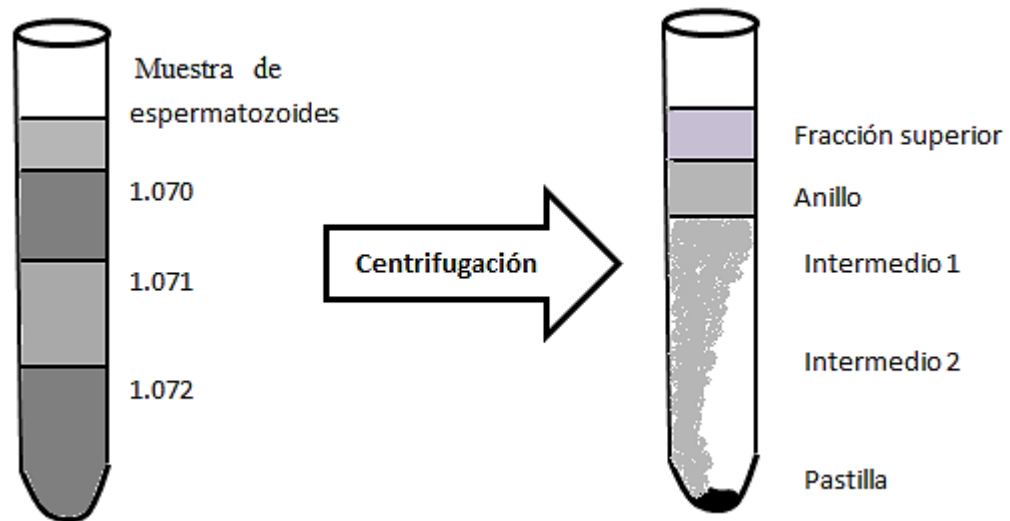


Figura 1. Esquema de la generación del gradiente discontinuo de Ficoll-diatrizoato de sodio, así como de las fracciones obtenidas después de la centrifugación de las muestras.

Evaluación de la integridad mitocondrial

Para la preparación de la solución stock de Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen, México) se tomó una alícuota (50µg) del producto, se resuspendió en 94.07µL de DMSO® (1mM). Una vez homogenizado se tomaron 2.5µL de esta solución, se colocaron en un tubo para microcentrífuga y se adicionaron 22.5µL de PBS para lograr una concentración de 500 nM. Las alícuotas de trabajo fueron cubiertas por papel aluminio y congeladas (-4°C) hasta su uso. Todo este proceso se realizó en un cuarto oscuro.

La evaluación de la integridad mitocondrial se realizó en cada una de las fracciones obtenidas después de la centrifugación para el sexado de semen; como grupo control se utilizaron espermatozoides del mismo eyaculado pero sin ser sometidos al proceso de centrifugación en gradiente de densidad. Las muestras contenían una concentración de 35 x

10^6 espermatozoides/ml en PBS, enseguida se adicionaron 0.5 μ L de la alícuota de trabajo previamente descongelada, se homogenizó, y enseguida fue incubada por 15 minutos en un baño María a 35°C [109]. Después, las muestras fueron centrifugadas a 2600 \times g por 3 minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla fue re-suspendida en 1 ml de paraformaldehído al 2% en PBS a 20°C por 10 minutos. Con el fin de retirar el fijador, las muestras fueron centrifugadas y nuevamente la pastilla se resuspendió en 200 μ L de PBS, se tomaron 20 μ L de la suspensión y se colocaron sobre un portaobjetos para realizar un frotis, dejando secar al aire, para después colocar 20 μ L del medio de montaje (ProLong® gold antifade reagent, Invitrogen, México), colocando un cubreobjetos; éste último fue sellado con barniz transparente para uñas. Una vez secas las laminillas se cubrieron con papel aluminio para su almacenaje a 4°C y posterior evaluación [109]. Los patrones de tinción fueron evaluados utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica DM 1000, cámara Pixera Penguin 600CL diflactor™) utilizando el programa viewfinder 3.0. Se contaron entre 50 y 200 espermatozoides por laminilla, identificándose 3 patrones de tinción en los espermatozoides de ovino, los cuales fueron clasificados como: I) mitocondrias integras: fluorescencia completa sobre la pieza media del espermatozoide (Figura 2A), II) mitocondrias “poco funcionales” y por lo tanto con daño: fluorescencia incompleta o parcial, así como una disminución de esta (Figura 2B, 2C).

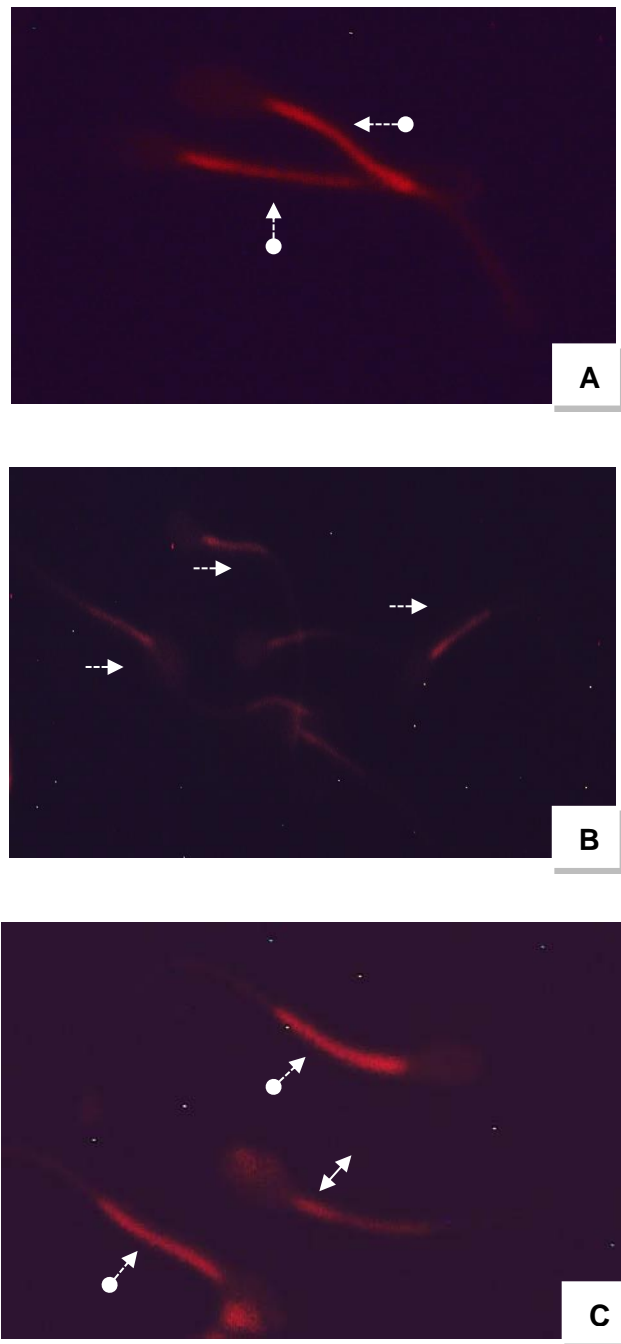


Figura 2. Imágenes de los patrones de tinción encontrados en las mitocondrias de los espermatozoides de ovino teñidos con MitoTracker Red CMXRos **A.** Fluorescencia en la pieza media completa. (100x) **B.** Disminución en la intensidad de fluorescencia en la pieza media (40x) **C.** Fluorescencia incompleta de la pieza media (100x) Las flechas indican la pieza media de los espermatozoides.

Evaluación del estado acrosomal

Para la preparación de la solución stock, la presentación del producto FITC-PNA (Invitrogen, México) contenía una concentración de 1 mg, para la cual fue re-suspendida en 1 ml de PBS (1000 µg/ml), se homogenizó y se tomaron 6µl de la solución y colocarla en un eppendorf para adicionar 99.4µl de PBS y obtener una concentración de 3µg/ml. Este proceso se realizó en un cuarto oscuro, cubriendo las alícuotas de trabajo en papel aluminio y congeladas (-4°C) hasta su utilización.

La evaluación del estado acrosomal fue realizada en cada una de las fracciones obtenidas después de la centrifugación para el sexado de semen; como grupo control se utilizaron espermatozoides del mismo eyaculado pero sin ser sometidos al proceso de centrifugación en gradiente de densidad. Se utilizó una concentración espermática de 35×10^6 espermatozoides/ml en PBS, realizándose en un cuarto oscuro. Las muestras fueron adicionadas con 20µL de la solución de trabajo y se dejaron incubar por 30 minutos en baño María a 35°C. Las muestras se centrifugaron a $2600 \times g$ por tres minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla recuperada se resuspendió en 1 ml de paraformaldehído al 2% en PBS y se dejó fijar por 10 minutos a 20°C. Pasado este tiempo nuevamente se centrifugó la muestra con el fin de retirar el fijador, eliminando el sobrenadante y re suspendiendo la muestra en 200µL de PBS [110]. Enseguida se tomaron 20µL de la muestra y fueron depositados en una laminilla para realizar un frotis, dejando secar al aire para posteriormente colocar 20µL del medio de montaje (ProLong® gold antifade reagent, Invitrogen, México) sobre la laminilla y enseguida se depositó un cubreobjetos, sellando con barniz transparente para uñas. Una vez secas las laminillas, se cubrieron con papel

aluminio para su almacenaje a 4°C y para su posterior evaluación en el microscopio de fluorescencia (Leica DM 1000, cámara Pixera Penguin 600CL diflactor™), utilizando el programa viewfinder 3.0. Se contaron entre 50 y 200 espermatozoides por laminilla, identificándose 4 patrones de fluorescencia en los espermatozoides de ovino (Figura 3). Los patrones se clasificaron como sigue: I) acrosoma integro: la fluorescencia completa en forma de media luna en parte apical de la cabeza espermática (Figura 3A); II) acrosoma integro: fluorescencia en la región acrosomal y región post acrosomal (Figura 3B, derecha superior); III) sin acrosoma (RA) o dañado: fluorescencia en la región ecuatorial-post acrosomal (Figura 3C) y fluorescencia dispersa sobre la cabeza del espermatozoide (Figura 3B, flecha izquierda inferior).

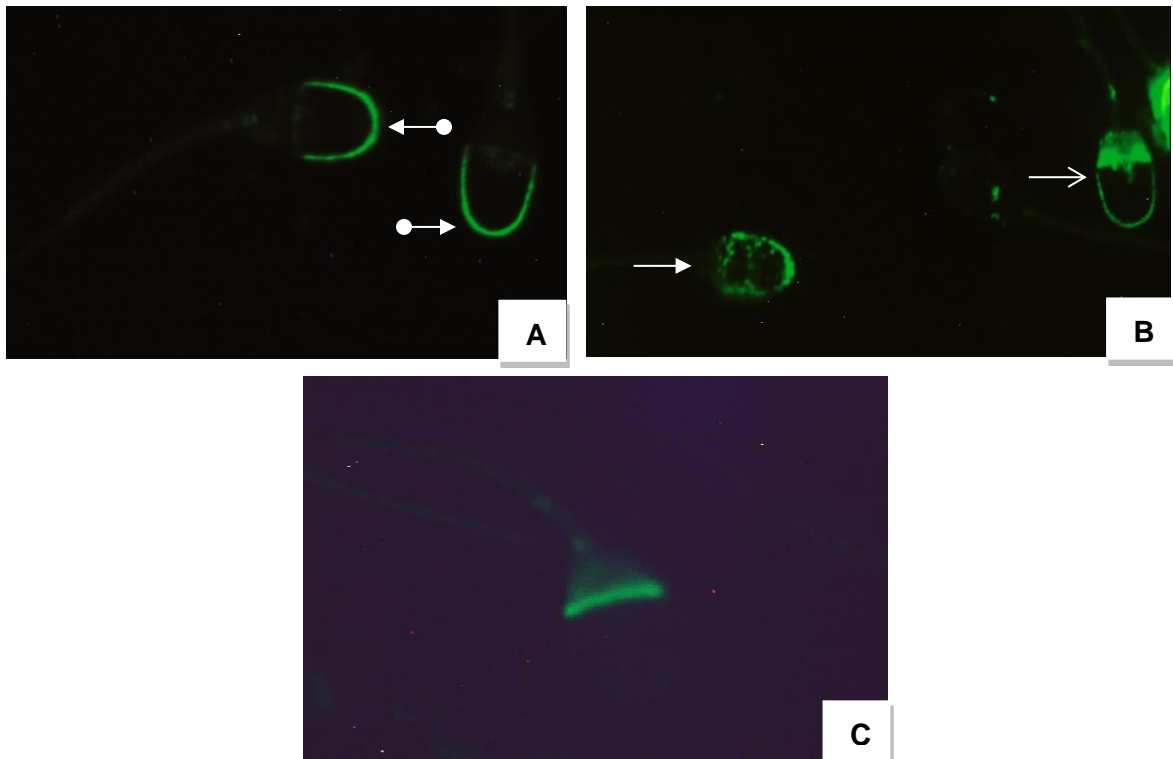


Figura 3. Microscopia de fluorescencia observada en los espermatozoides de ovino teñidos con FITC-PNA para evaluar el acrosoma. **A.** Espermatozoides con el acrosoma intacto (100x) ●→ . **B.** Espermatozoide con el acrosoma intacto → y espermatozoide con acrosoma dañado, sin presencia de acrosoma → (100x). **C.** Espermatozoide con reacción acrosomal (RA) (100x).

Valoración de las poblaciones espermáticas X y Y por citometría de flujo

Esta fase del experimento se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ), Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda, Siglo XXI, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Todas las fracciones recuperadas del gradiente de densidad fueron evaluadas por citometría de flujo, ajustando la concentración a 15×10^6 espermatozoides/ml depositados en tubos de 5 ml con tapa para citometría de flujo. Se utilizó un medio para semen fresco llamado vellón dorado, (citrato de sodio 2.8 g, ácido cítrico 0.8 g, estreptomicina 0.005 g, penicilina 0.006 g en 100 ml de agua destilada), el cual fue usado para evitar aglutinaciones o uniones inespecíficas.

Se adicionaron 25 μ L de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, México) a una concentración de 224 μ M dejando incubar a 35°C por 60 minutos [20] en cuarto oscuro, cabe señalar que se utilizaron dos muestras por cada fracción a evaluar, dejando como control una de ellas sin teñir mientras que para las muestras testigos se utilizaron espermatozoides del mismo eyaculado, teñidos con Hoechst 33342, pero que no fueron sometidos al proceso de centrifugación en gradiente de densidad. Para su transporte, las muestras fueron colocadas en una hielera con refrigerantes y una cama de agua a 35°C.

Previo a la adquisición en el citómetro de flujo, las muestras fueron centrifugadas a 2600 x g por 3 minutos y re-suspendidas en 1 ml del mismo medio de transporte, esto con la finalidad de obtener una mejor lectura de la fluorescencia en el citómetro de flujo.

El equipo utilizado fue un FACSAria® (BD Biosciences), con el láser de Argón (emisión a 488 nm) y un diodo violeta (emisión a 435nm) encendidos y el detector de Pacific Blue activado. Este último puede detectar señales del fluorocromo Hoechst. Se adquirieron 10,000 eventos seleccionados por tamaño (detector FSC señales área y pico (A y H)), complejidad (detector SSC señales área y pico (A y H)) y fluorescencia (detector Pacific Blue, señales área y pico (A y H)). Los datos fueron analizados con el programa Infinicyt versión 1.5 (Figura 4). Este proceso fue estandarizado para el espermatozoide de ovino.

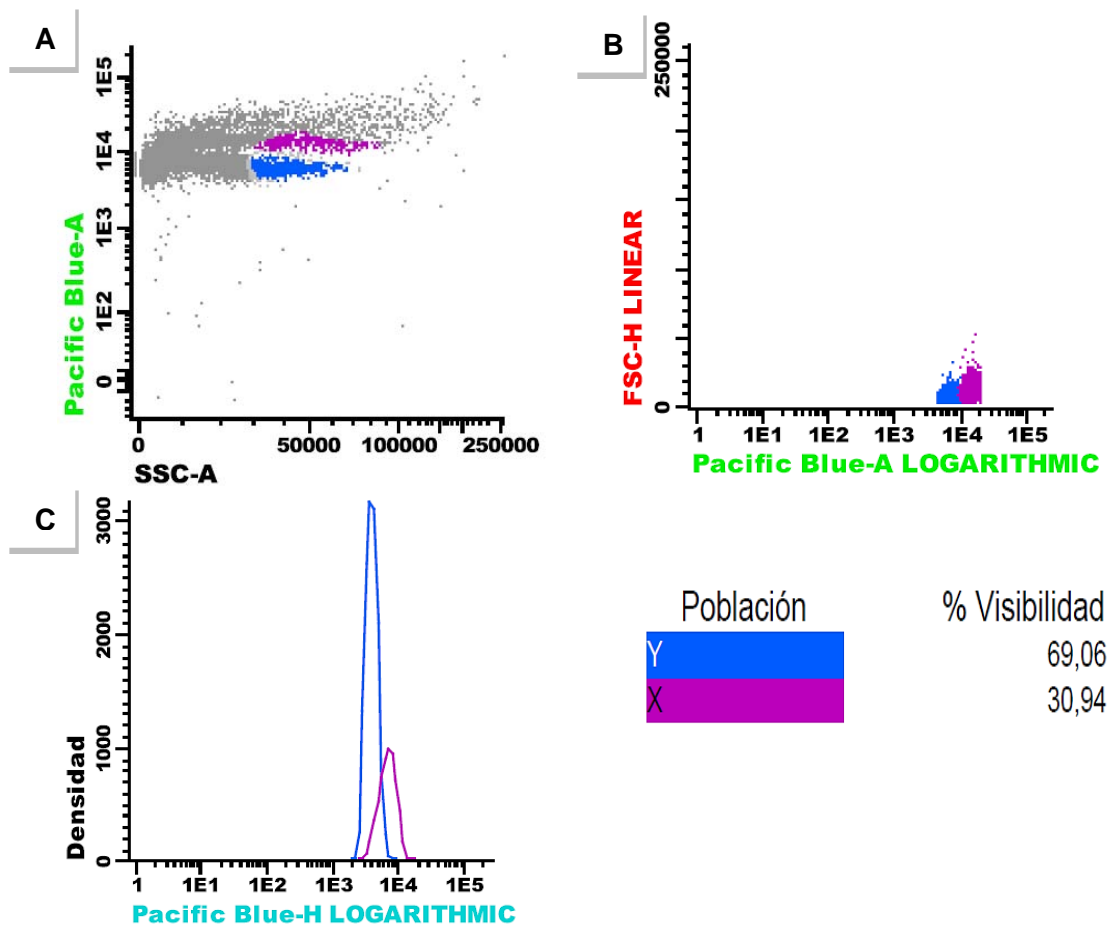


Figura 4. Gráficas del análisis por citometría de flujo de las poblaciones espermáticas X y Y de un eyaculado de ovino teñido con Hoechst 33342, sometido a la centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio. **A.** Gráfica de puntos, para observar las poblaciones utilizando la fluorescencia de Hoechst (Pacific blue-H) y la complejidad (SSC-A). **B.** Gráfica de puntos donde se observan las dos poblaciones espermáticas, utilizando su tamaño (FSC-H) y la fluorescencia de Hoechst (Pacific blue-A). **C.** Histograma de la fluorescencia de Hoechst donde se observa que la población de espermatozoides X (lila) contiene mayor contenido de DNA (densidad) y por lo tanto una mayor fluorescencia que el espermatozoide Y (azul).

Este ensayo, se realizó para verificar la correcta identificación de las poblaciones espermáticas en el citómetro de flujo, para ello se seleccionó un macho al azar perteneciente al grupo de estudio; el sexado del semen se realizó como ya fue descrito, pero para el análisis por citometría de flujo se utilizó una concentración de 1×10^6 espermatozoides en un volumen de 100 μ L del medio vellón dorado. Para obtener los núcleos espermáticos se utilizó Coulter® DNA Prep™ reagent kit (Fisher Scientific), colocando 100 μ L de la solución A (coctel de proteasas) manteniendo homogenizada la muestra por 20 segundos, inmediatamente se le adicionó 1 ml de la solución B (ioduro de propidio), dejando incubar por 10 minutos en la oscuridad y agitando cada 2 minutos, enseguida las muestras fueron leídas en el citómetro.

El equipo utilizado fue un FACSAria® (BD Biosciences), con el láser de Argón (emisión a 488 nm) encendido y los detectores Texas-RED y PerCP-Cy5.5 activados. Se adquirieron 10,000 eventos seleccionados por tamaño (detector FSC señales área y pico (A y H)), complejidad (detector SSC señales área y pico (A y H)) y fluorescencia (Texas Red señales área y pico (A y H)). Los datos fueron analizados con el programa FACSDiva versión 6.1.3 (Figura 5).

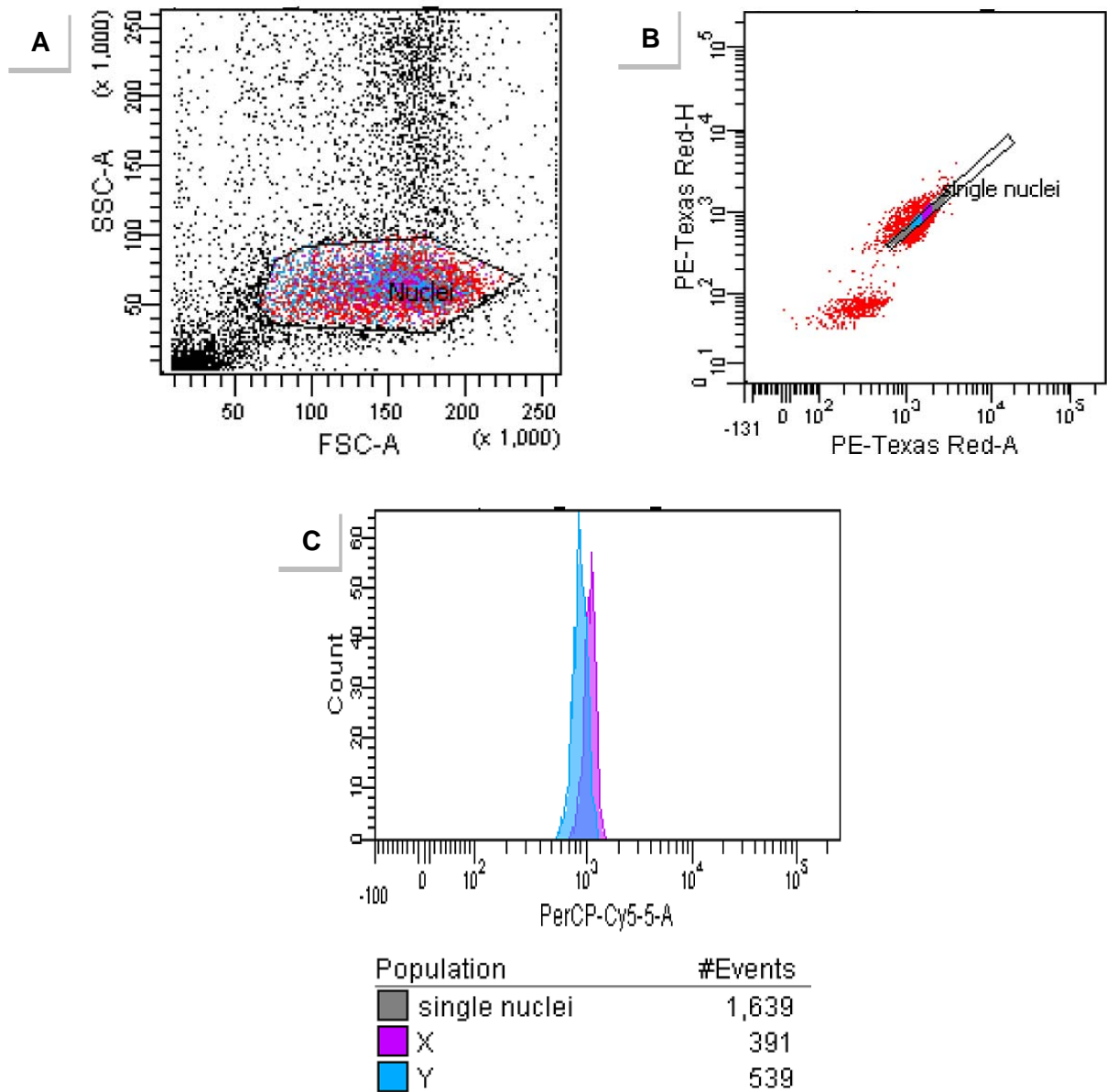


Figura 5. Gráficas de citometría de flujo de los núcleos espermáticos obtenidos del semen ovino, de muestras centrifugadas en gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio. **A.** Gráfica de puntos donde se observan los patrones de tamaño y complejidad de las poblaciones espermáticas. **B.** Gráfica de puntos, comparando las señales pico (H) y área (A) de la fluorescencia para yoduro de propidio (PE-Texas Red-H, PE-Texas Red-A), **C.** Histograma de la fluorescencia de yoduro de propidio donde se observa que la población de espermatozoides X (lila) contiene mayor contenido de DNA (densidad) y por lo tanto una mayor fluorescencia que el espermatozoide Y (azul).

Congelación de muestras sexadas por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio

La fase de congelación se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) de la FMVZ-UNAM. Para ello, se colectó por medio de una vagina artificial 1 ó 2 eyaculados de los 5 machos utilizados en este estudio (2 raza suffolk, 3 de raza dorset). Las muestras obtenidas fueron colocadas en baño maría a 37°C y se realizó una dilución 1:1 con PBS a la misma temperatura, realizándose la evaluación de la motilidad progresiva, para tal fin se colocó una gota de la muestra en una laminilla precalentada a 37°C y se evaluó al microscopio de luz (Leica DME) con un objetivo de 40x, enseguida se realizó la evaluación de la viabilidad espermática con azul Tripán al 0.4%, así como la concentración espermática para cada muestra (técnicas descritas anteriormente).

Para realizar la centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, (técnica que ya fue descrita anteriormente) se utilizaron un total de 24 tubos por macho, con la finalidad de obtener una concentración espermática apropiada de la población enriquecida. Una vez realizada la centrifugación se tomó la fracción de interés de los 24 tubos por cada macho y se concentró un tubo de ensaye de 15 ml para ser centrifugados a $2600 \times g$ por 5 minutos, esto con la finalidad de retirar residuos del gradiente, al obtener la pastilla se realizó una dilución 1:1 con PBS, se homogenizó y nuevamente se determinó la viabilidad y concentración espermática.

Para preparar el medio de congelación, se utilizó el diluyente comercial Tryladil® al 20%, adicionado con 60% agua destilada y 20% de yema de huevo, se homogenizó y fue filtrado

con papel filtro (19 mm) para eliminar residuos de huevo. Para su congelación la concentración espermática se ajustó a 5×10^6 espermatozoides/ ml, en el medio de congelación. Enseguida se llenaron pajillas francesas de 0.25 ml (Minitübe, México) previamente identificadas, las cuales fueron selladas con alcohol polivinílico, introduciendo solo un extremo de la pajilla en agua desionizada. Se secaron con una toalla de papel y se almacenaron en los gobelets y estos a su vez en bastones, previamente identificados, los cuales fueron mantenidos a 4°C por un periodo de 2 horas. Después se colocaron sobre una gradilla de metal, introducida dentro de una hielera de unicel que contenía una capa de 4 cm de nitrógeno líquido, y se dejaron por 8 minutos, manteniendo tapada la hielera, posteriormente se tomaron los bastones, con ayuda de unas pinzas de disección y se introdujeron directamente sobre el nitrógeno líquido que contenía la hielera de unicel durante 3 minutos y finalmente se depositaron los bastones en una canastilla del tanque de nitrógeno [106], dejando almacenadas las muestras por 30 días.

Descongelación de pajillas

Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Morfología de la FMVZ-UNAM.

Se descongelaron 10 pajillas sexadas por cada macho y 5 pajillas por cada control, para ello se colocaron una por una en el baño maría a 37°C por 20 segundos. El contenido de cada pajilla fue depositada en un tubo de ensaye de 10 ml. Posteriormente se tomó una gota de la muestra para ser depositada sobre una laminilla precalentada a 37°C y evaluar la motilidad progresiva de las muestras al descongelado. Consecutivamente se adicionaron 8 ml del

medio vellón dorado a 35°C y las muestras se centrifugaron a 2600 \times g por 8 minutos con la finalidad de retirar el medio de congelación, la pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml del medio vellón dorado.

A continuación se determinó la viabilidad espermática, depositando sobre un tubo eppendorf 10 μ L de semen, 190 μ L de vellón dorado, la muestra fue homogenizada, para enseguida adicionar 10 μ L de azul Tripán al 0.4%, nuevamente homogenizando y colocando 10 μ L por cada cámara de Neubauer e inmediatamente evaluar al microscopio de luz.

Para evaluar la integridad mitocondrial e integridad acrosomal (métodos descritos anteriormente) se descongelaron 5 pajillas de semen sexado para cada macho y 5 de cada control respectivo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa SPSS versión 19 realizando una estadística descriptiva para los parámetros de motilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad espermática, así como para los datos generados por citometría de flujo para evaluar la distribución de los espermatozoides con cromosoma X y Y en las distintas fracciones obtenidas del gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio.

Para evaluar los patrones de fluorescencia de cada una de las fracciones obtenidas del gradiente de densidad, tanto para la integridad mitocondrial como acrosomal, se empleó estadística no paramétrica utilizando el programa GraphPad Prism 5, a través de la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación entre grupos.

Para muestras al descongelado, la evaluación de la integridad mitocondrial fue analizada utilizando una prueba de Mann-Whitney. Mientras que para evaluar la integridad acrosomal se utilizó Excel Word Office 2010. La evaluación de la viabilidad y motilidad espermática fue realizada a través de una prueba de T para muestras relacionadas.

Finalmente, para determinar si la proporción obtenida de espermatozoides X y Y por la centrifugación en gradiente de densidad tenía relación entre los machos utilizados, se realizó una prueba T para muestras relacionadas, esta misma prueba fue también usada para determinar si las razas influyeron en el tratamiento empleado.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los valores de evaluación para los eyaculados de ovino antes del sexado. Observándose una media en la motilidad espermática de 81.30%, así como una viabilidad del 92.81%, mientras que la media para la concentración espermática fue de 320.58, con valores de $266.79 < \mu < 374.38$, con un intervalo de confianza del 95%.

Cuadro 1. Valores descriptivos para los parámetros evaluados en los eyaculados de ovino antes del sexado por gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio (n=26)

Parámetros	Valor descriptivo			
	Media	IC al 95%	Varianza	Desviación típica
Motilidad espermática (%)	81.30	$78.47 > \mu < 84.13$	51.140	7.151
Viabilidad espermática (%)	92.81	$90.30 > \mu < 95.33$	30.530	5.5251
Concentración espermática (millones/ ml)	320.58	$266.79 > \mu < 374.38$	18493.24	135.989

En el cuadro 2 se observan los valores de la media e intervalos de confianza para la viabilidad espermática en cada fracción obtenida después del sexado por centrifugación,

siendo en la fracción superior y la pastilla donde se presentó el porcentaje mayor de viabilidad con 93.33% y 93.14%, respectivamente.

Cuadro 2. Valores descriptivos para la viabilidad espermática expresada en porcentaje para las 5 fases generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio (n=26)

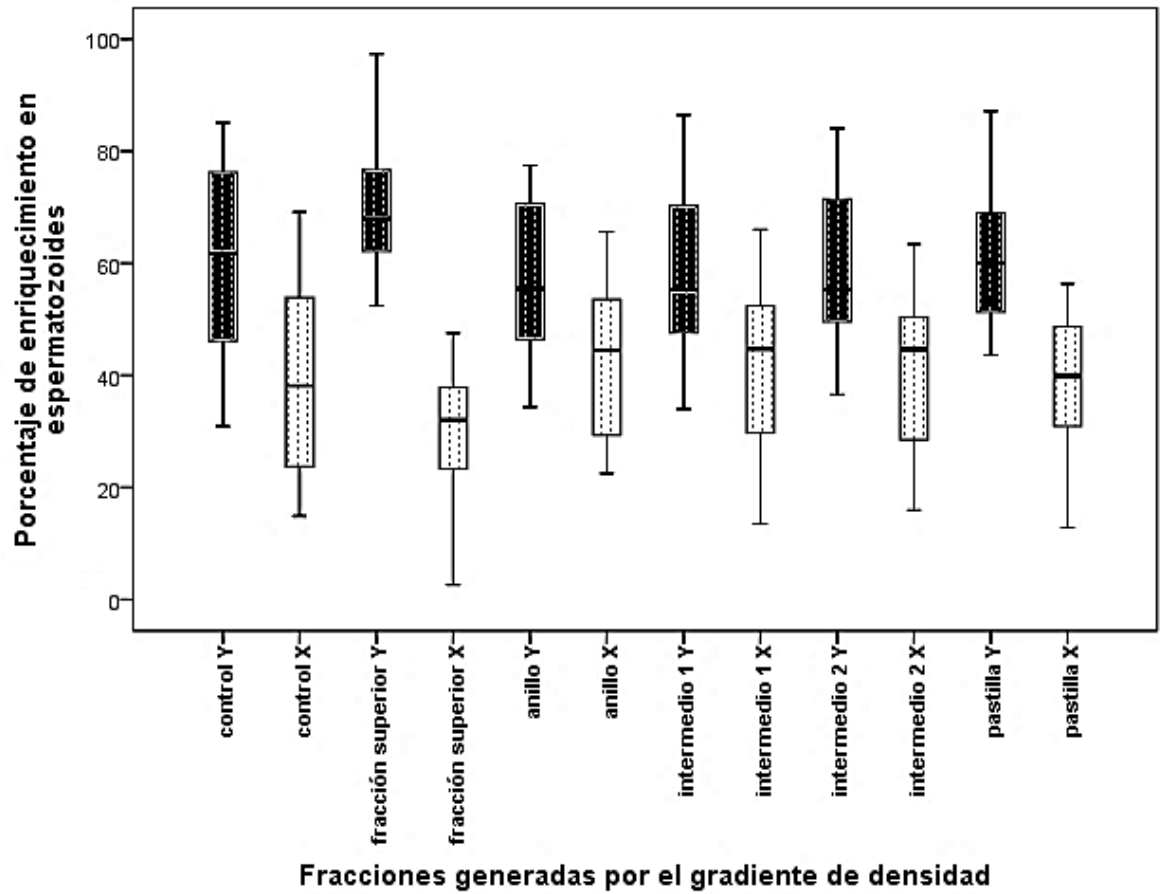
Viabilidad espermática (%)	Valor descriptivo					
	Fases	Media	IC al 95%	Varianza	Desviación típica	Error típico
Capa superior	93.33	90.85	$\mu < 95.80$	29.596	5.44	1.187
Anillo	92.89	90.71	$\mu < 95.07$	27.85	5.27	1.055
Intermedio 1	91.21	88.48	$\mu < 93.94$	41.851	6.469	1.320
Intermedio 2	90.53	86.57	$\mu < 94.50$	92.321	9.608	1.921
Pastilla	93.14	91.26	$\mu < 95.03$	19.910	4.462	0.910

La concentración espermática (millones/ml) para cada fracción después del sexado mediante centrifugación, se observa en el cuadro 3, mostrando que en la fracción de anillo existe una mayor concentración (60.28×10^6 / ml), seguida por la de 14.28×10^6 / ml para la fracción de intermedio 2 y una menor proporción de espermatozoides para la fracción superior con 9.40×10^6 /ml. Al comparar estos valores con la viabilidad espermática antes del sexado (Cuadro 2) se observa que en la fracción de capa superior y pastilla existe un porcentaje mayor de espermatozoides viables, al utilizar este tipo de gradiente.

Cuadro 3. Valores descriptivos para la concentración espermática expresada en millones por mililitro para las distintas fases generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio (n=26).

Concentración espermática (millones/ ml)	Valor descriptivo					
	Fases	Media	IC al 95%	Varianza	Desviación típica	Error típico
Capa superior	9.401	7.69	$\mu < 11.10$	15.564	3.945	0.822
Anillo	60.28	55.45	$\mu < 65.12$	137.01	11.705	2.341
Intermedio 1	14.28	10.35	$\mu < 18.21$	86.591	9.305	1.899
Intermedio 2	10.20	8.80	$\mu < 11.59$	10.920	3.304	0.674
Pastilla	11.11	9.24	$\mu < 12.97$	20.437	4.520	0.904

Al evaluar por citometría de flujo las poblaciones de espermatozoides X y Y presentes en cada fracción obtenida por el sexado de semen en gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, se encontró que la población que tuvo el mayor enriquecimiento fue la de los espermatozoides Y, (Gráfica 1), encontrándose estos en la fracción o capa superior comparado con el control (Cuadro 4).



Gráfica 1. Valoración por citometría de flujo del enriquecimiento de espermatozoides X y Y en las distintas fases generadas por el sexado de semen con la centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio (n=26).

Cuadro 4. Valores descriptivos de la evaluación por citometría de flujo de las poblaciones espermáticas obtenidas de las distintas fracciones del gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio para el sexado del semen ovino (n=26).

Población espermática por fracción (%)	Valor descriptivo				
	Media	IC al 95%	Varianza	Desviación típica	Error típico
Control Y	61.22	52.49> μ <69.94	254.84	15.963	3.130
Control X	38.77	30.05> μ <47.50	254.84	15.963	3.130
Capa superior Y	69.88	63.56> μ <76.19	133.54	11.556	2.266
Capa superior X	30.11	23.80> μ <36.43	133.54	11.548	2.266
Anillo Y	56.51	49.53> μ < 63.50	163.27	12.777	2.505
Anillo X	43.47	36.49> μ <50.46	163.24	12.776	2.505
Intermedio 1 Y	56.06	46.31> μ <65.81	318.40	17.843	3.499
Intermedio 1 X	43.93	34.18> μ <53.68	318.40	17.843	3.499
Intermedio 2 Y	58.89	51.22> μ <66.55	196.49	14.017	2.749
Intermedio X	41.10	33.44> μ <48.77	196.49	14.017	2.749
Pastilla Y	59.99	51.64> μ <68.34	233.22	15.271	2.995
Pastilla X	40.00	31.65> μ <48.35	233.22	15.271	2.995

Una vez evaluada la distribución y enriquecimiento de las poblaciones espermáticas por citometría de flujo con estos mismos datos se determinó, por medio de una T para muestras relacionadas, si dicho enriquecimiento de espermatozoides X y Y generado por el sexado tenía relación con los machos empleados en este estudio, encontrándose una diferencia significativa entre todas las medias de los espermatozoides con cromosoma X y Y ($p < 0.01$) (Cuadro 5). Además, al valorar si las razas utilizadas en este estudio tuvieron influencia sobre el tratamiento utilizando, no se encontró una diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) (Cuadro 6).

Cuadro 5. Medias por machos (n=6) de los espermatozoides X y Y, obtenidos de las fracciones generadas por el sexado y evaluados por citometría de flujo.

Machos	Medias de los espermatozoides	
	Y	X
1	38.26	24.23
2	43.67	18.82
3	35.32	27.17
4	35.04	27.45
5	36.80	25.69
6	37.49	25.00

Se encontró diferencia significativa de medias para espermatozoides X y Y ($p < 0.01$)

Cuadro 6. Medias por raza (n=2) de los espermatozoides X y Y por fracciones obtenidas por el sexado y evaluadas por citometría de flujo.

Fracción del gradiente	Raza del animal	N	Medias
Control Y	suffolk	13	35.21
	dorset	13	41.31
Control X	suffolk	13	27.28
	dorset	13	21.18
Capa Superior Y	suffolk	13	45.56
	dorset	13	41.79
Capa Superior X	suffolk	13	16.93
	dorset	13	20.70
Anillo Y	suffolk	13	34.00
	dorset	13	36.64
Anillo X	suffolk	13	28.49
	dorset	13	25.85
Intermedio1 Y	suffolk	13	32.71
	dorset	13	37.36
Intermedio1 X	suffolk	13	29.78
	dorset	13	25.13
Intermedio 2 Y	suffolk	13	34.26
	dorset	13	39.34
Intermedio2 X	suffolk	13	28.23
	dorset	13	23.15
Pastilla Y	suffolk	13	38.02
	dorset	13	36.97
Pastilla X	suffolk	13	24.47
	dorset	13	25.52

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre las razas para ninguna de las fracciones generadas por el gradiente de densidad.

Para la criopreservación del semen sexado se seleccionó la fracción superior (cuadro 4), debido a que esta mostró el mayor enriquecimiento de espermatozoides Y, así como buenas condiciones de viabilidad celular (cuadro 2). En el cuadro 7 se presentan los valores descriptivos para este tipo de muestras antes de ser sometidas al sexado por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, observándose que la media para el porcentaje de motilidad fue de 91% y de 99.46% para la viabilidad espermática, mientras que la concentración espermática fue de 398.40×10^6 / ml.

Cuadro 7. Valores descriptivos para los parámetros evaluados en los eyaculados de ovino antes del sexado para su posterior congelación (n=5).

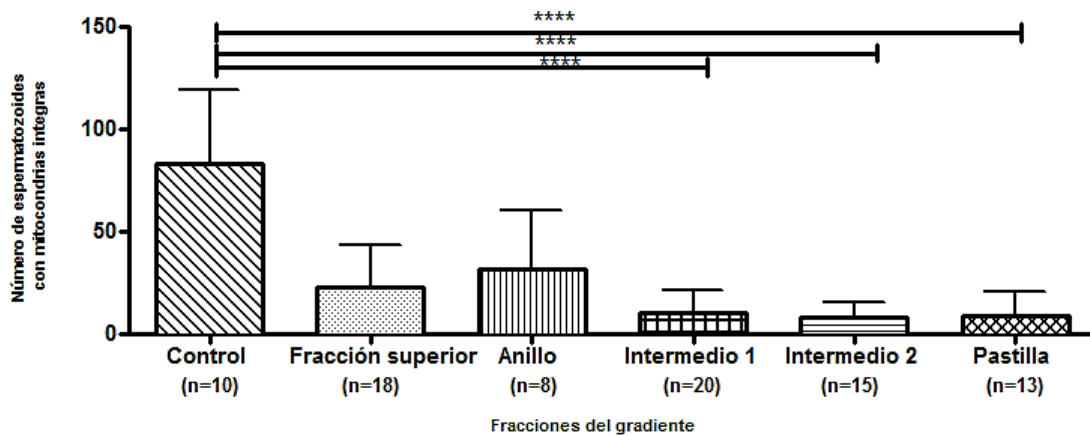
Parámetro	Valor descriptivo				
	Media	IC 95%	Varianza	Desv. Tip	Error Tip.
Motilidad espermática (%)	91.00	85.81< μ <96.19	17.500	4.183	1.871
Concentración espermática (Millones/ ml)	398.40	233.71< μ < 563.09	17592.300	132.636	59.317
Viabilidad espermática (%)	99.45	97.9305< μ <100.9735	1.502	1.2253	.54800

Después del sexado por centrifugación, los valores para la fracción recuperada (fracción superior), fueron de 92.17% para la viabilidad, mientras que la media para la concentración espermática fue de 68×10^6 células/ ml (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valores descriptivos de las muestras obtenidas de la fracción sexada por gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, antes de la criopreservación (n=120)

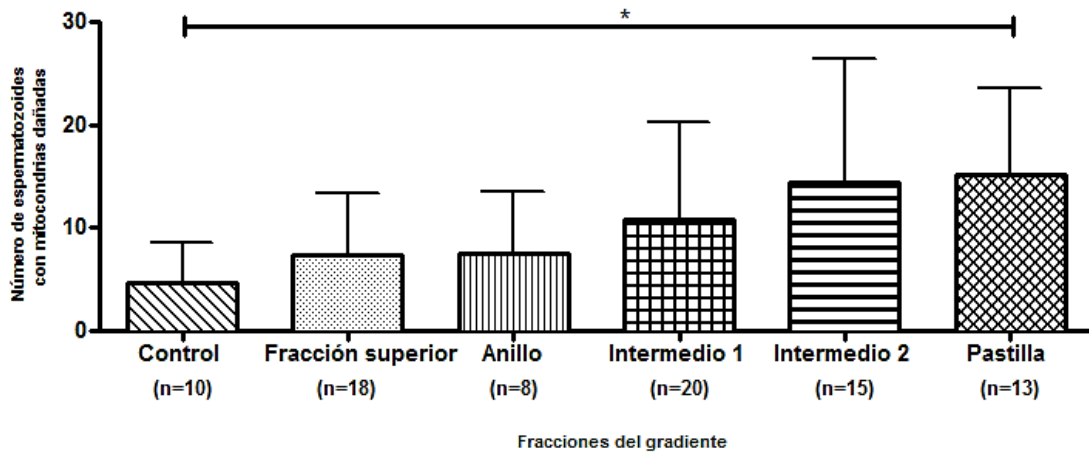
Parámetro	Valor descriptivo				
	Media	IC 95%	Varianza	Desv. Tip	Error Tip.
Concentración espermática (160×10^6/ ml)	68.00	32.17> μ >103.83	832.500	28.853	12.903
Viabilidad espermática (%)	92.17	85.69> μ <98.64	27.202	5.2155	2.3324

Por otra parte, la evaluación de la integridad mitocondrial realizada en los espermatozoides de ovino obtenidos de las distintas fracciones, mostraron un promedio de 31.5 células en la fracción de anillo, 23.11 células para la fracción superior, 10.4 células en la fracción de intermedio 1, 8.4 células en intermedio 2 y en la pastilla 9.07 células con integridad mitocondrial, pero solo se encontró una diferencia significativa ($p < 0.0001$) en estas últimas tres fracciones en comparación con el control ($\mu = 83.2$) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Medias de los conteos de espermatozoides que presentaron integridad mitocondrial en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia estadística $p < 0.0001$, para las fracciones de intermedio 1****, intermedio 2**** y pastilla**** comparadas con el control.

La gráfica 3 se muestra el daño mitocondrial en estas mismas muestras, presentando una media de 7.3 células para la fracción superior, anillo (7.5 células), intermedio 1 (10.9 células), intermedio 2 (15.23 células), pastilla (15.23 células) y el control (4.7 células). Encontrándose una diferencia significativa ($p > 0.0001$) para la fracción de intermedio 1, intermedio 2 y la pastilla comparadas con el control.

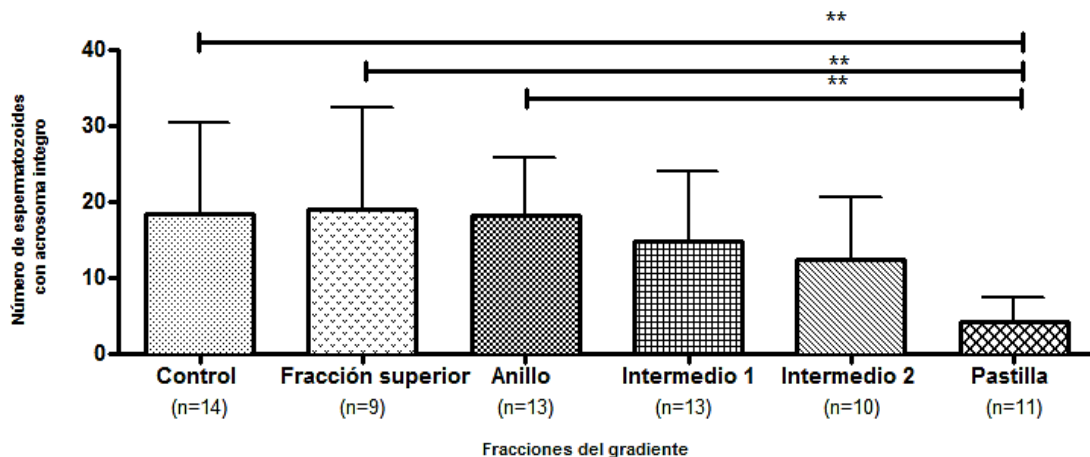


Gráfica 3. Medias de los conteos de espermatozoides con daño mitocondrial para las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa de ($p > 0.0235$)* para la fracción de la pastilla.

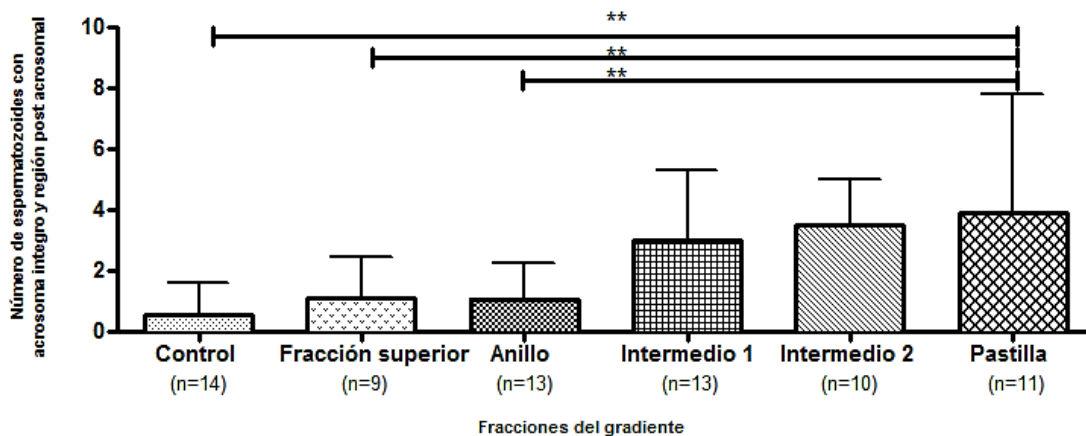
La evaluación de la integridad acrosomal para estas mismas muestras se presenta en la gráfica 4, donde se observa las medias de los conteos de espermatozoides con acrosomas íntegros (fluorescencia en la región apical de la cabeza), para la fracción superior fue de 19.11 células, para la de anillo (18.15 células), intermedio 1 (14.76 células), intermedio 2 (12.4 células), la pastilla (4.18 células) y el control (18.5 células), encontrándose solo diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$), la fracción superior ($p < 0.0092$) y anillo ($p < 0.0012$) comparadas con la pastilla.

En la gráfica 5, se muestran los valores de las medias para el número de espermatozoides que presentaron también acrosoma íntegro pero con fluorescencia en la región acrosomal y post acrosomal, en donde para la fracción superior fue de 1.11 células, anillo 1.07 células, intermedio 1 3 células, intermedio 2 3.5 células y la pastilla 3.90 células y el control 0.071 células, mostrando una diferencia significativa para este último ($p < 0.0061$), la fracción superior ($p < 0.0092$) y el anillo ($p < 0.0012$) comparadas con la pastilla. En la misma se

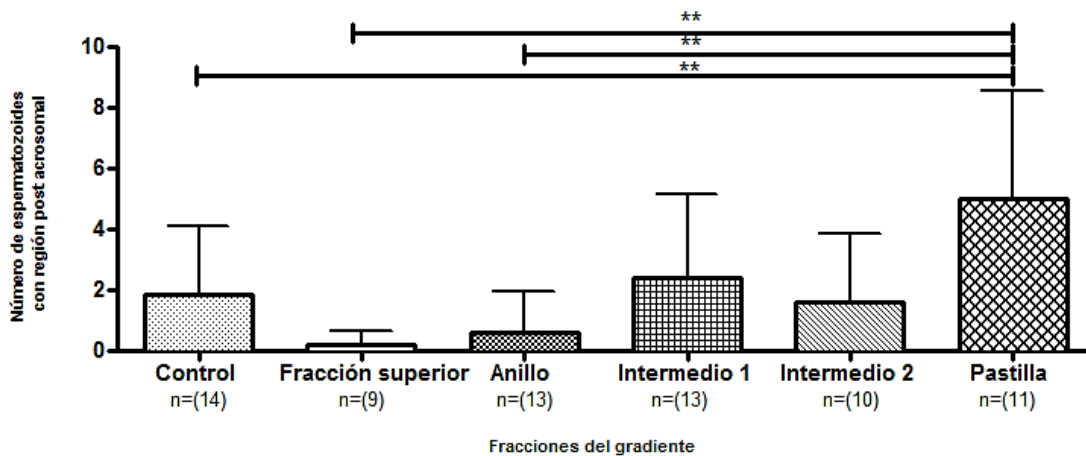
puede apreciar que el valor de las medias va aumentando discretamente conforme las fracciones del gradiente se profundizan. Los espermatozoides que presentaron alteraciones en el acrosoma (dañado), es decir, fluorescencia difusa sobre la cabeza se observa en la gráfica 6, mostrando las medias del número de células para cada fracción: fracción superior (0.22), anillo (0.61), intermedio 1 (2.38), intermedio 2 (1.6), la pastilla (5) y el control (1.85), encontrando solo diferencia estadística para éste último ($p < 0.0061$), la fracción superior ($p < 0.0092$) y la fracción de anillo ($p > 0.0012$) comparada con la pastilla. Finalmente las medias del número de espermatozoides que presentaron la pérdida o ausencia del acrosoma (espermatozoides con reacción acrosomal (RA)) se encuentran en la gráfica 7, mostrando en la fracción superior (0.14 células), Anillo (0.07 células), intermedio 1 (0.76 células), intermedio 2 (0.1 células), la pastilla (1.27 células) y el control (0.14 células), encontrando solo diferencia significativa en el control ($p < 0.0061$), la fracción superior ($p < 0.0092$) y anillo ($p < 0.0012$) comparadas con la pastilla.



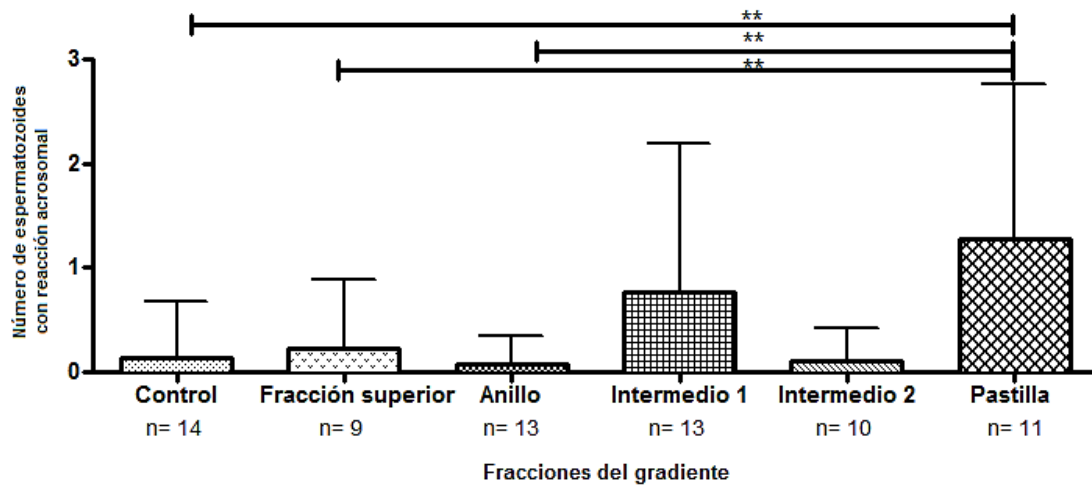
Gráfica 4. Medias de los conteos de espermatozoides que presentaron integridad acrosomal en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$ **) **, para la fracción superior ($p < 0.0092$ **) ** y anillo ($p < 0.0012$ **) ** comparadas con la pastilla.



Gráfica 5. Medias de los conteos de espermatozoides con acrosoma íntegro y región post acrosomal en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$), para la fracción superior ($p < 0.0092$) y anillo ($p < 0.0012$) comparadas con la pastilla.



Gráfica 6. Medias de los conteos de espermatozoides con fluorescencia difusa sobre la cabeza en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$) **, para la fracción superior ($p < 0.0092$) ** y anillo ($p < 0.0012$) ** comparadas con la pastilla.



Gráfica 7. Medias de los conteos de espermatozoides que presentaron una pérdida del acrosoma en las distintas fracciones generadas por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, mostrando una diferencia significativa para el control ($p < 0.0061$) **, para la fracción superior ($p < 0.0092$) ** y anillo ($p < 0.0012$) ** comparadas con la pastilla.

En el cuadro 9 se presenta la evaluación de la viabilidad de las muestras criopreservadas, no presentándose una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el semen sexado por el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio y el control; de la misma manera no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) al evaluar la motilidad progresiva al descongelado (ver Cuadro 10).

Cuadro 9. Porcentaje de la viabilidad espermática del semen sexado al descongelado comparada con el control

Viabilidad espermática	Media	Desv. típica	Error típico	IC al 95%	t	gl	correlación	Sig.
Control (n=25)	73.01	11.90	2.38	-8.01 > μ < 5.60	.365	24	-.166	.428
Semen sexado (n=50)	74.21	9.61	1.92					

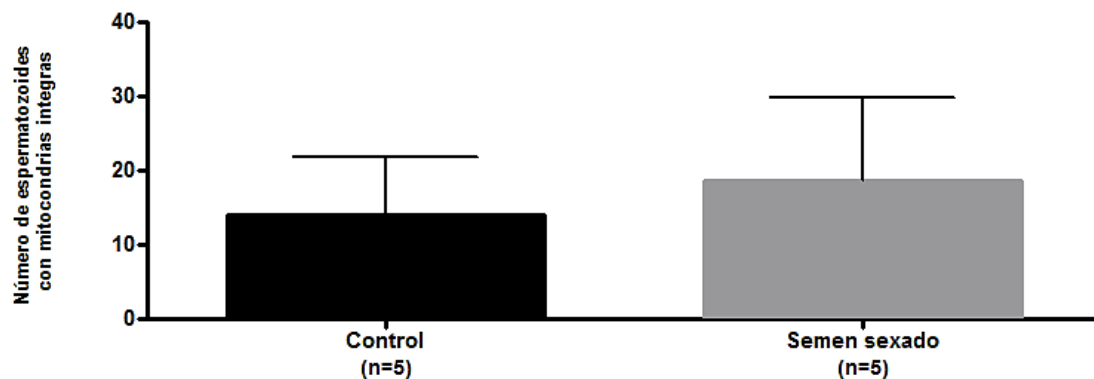
No se encontró diferencia significativa entre grupos ($P > 0.05$)

Cuadro 10. Porcentaje de la motilidad progresiva del semen sexado al descongelado comparada con el control.

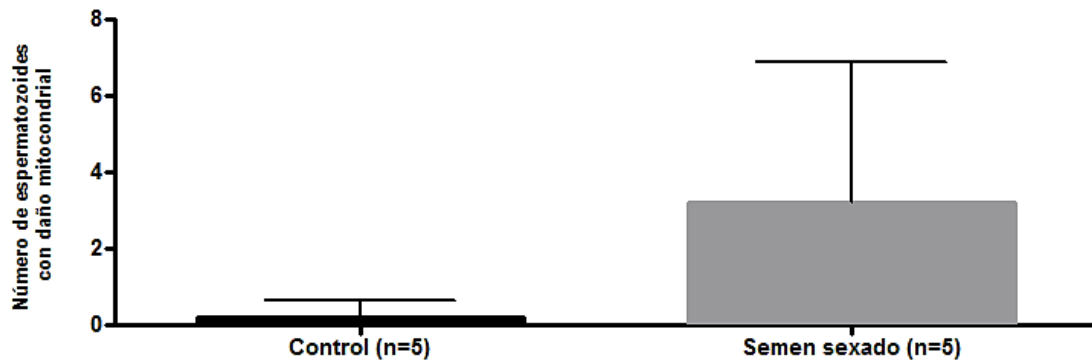
Motilidad espermática	Media	Desv. típica	Error típico	IC al 95%	t	gl	correlación	Sig.
Control (n=25)	5.16	2.41	.482	.446> μ <1.954	3.286	24	.653	.003
Semen sexado (n=50)	3.96	1.51	.303					

Se encontró diferencia significativa entre grupos (P<0.05)

De igual forma, la valoración de la integridad mitocondrial en los espermatozoides al descongelado no mostró diferencia significativa entre grupos (Gráfica 8), presentando una media de 14 para el control y para el semen sexado 18.6, de la misma manera las medias para los espermatozoides que presentaron daño mitocondrial fue de 0.2 para el control y 3.2 para el semen sexado, no mostrando diferencia significativa entre grupos (Gráfica 9).

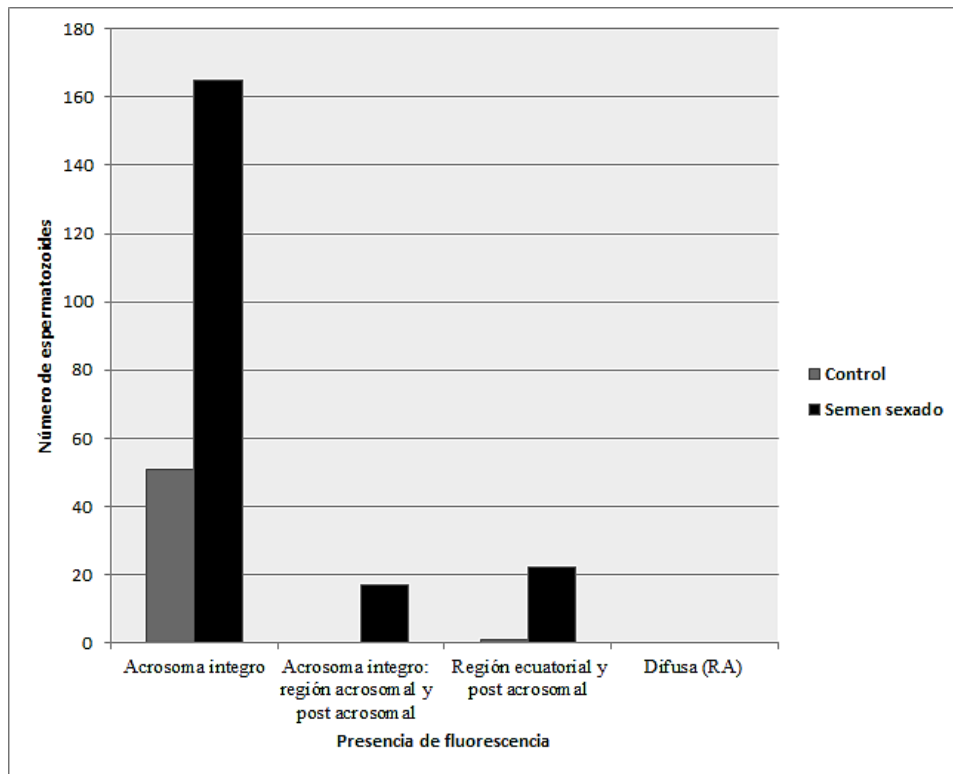


Gráfica 8. Medias de los conteos de los espermatozoides que presentaron integridad mitocondrial al descongelado. No se encontró diferencia significativa entre grupos ($p>0.7533$).



Gráfica 9. Medias de los conteos para los espermatozoides que presentaron daño mitocondrial en espermatozoides de ovino al descongelado. No se encontró diferencia significativa entre grupos ($p > 0.1579$).

En la gráfica 10, se muestra el número de espermatozoides de ovino al descongelado que presentaron el acrosoma íntegro, observándose que el semen sexado presentó 165 espermatozoides con acrosomas íntegros, 17 con acrosoma íntegro y fluorescencia en la región post acrosomal, 22 espermatozoides con fluorescencia difusa sobre la cabeza y ninguno con reacción acrosomal (RA), mientras que para el control 51 con acrosoma íntegro y solo uno fluorescencia difusa en la cabeza.



Gráfica 10. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides de ovino al descongelado. (n=7)

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un enriquecimiento del 70% de espermatozoides de ovino con cromosoma Y al utilizar la centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, validado por citometría de flujo. El utilizar un número grande (N=26) de muestras [111] permitió caracterizar la distribución de los espermatozoides X y Y a través del gradiente de densidad utilizado, lo cual no se había realizado en trabajos anteriores [2, 10, 46]. Además, el uso de la citometría de flujo, como herramienta de validación, permitió evaluar de forma rápida y precisa la proporción de las poblaciones espermáticas obtenidas, sin embargo ello requirió de una estandarización previa, lo cual necesitó de inversión de tiempo; resaltando el hecho de que es una técnica que presenta dificultades y particularidades para su uso en los espermatozoides, pero que una vez establecida es una herramienta valiosa para la Medicina Veterinaria, en particular en el área de reproducción animal [14].

Como constancia de la repetibilidad de la técnica empleada en este estudio, la concentración espermática obtenida en las diferentes fracciones recuperadas se mantuvieron constantes a través de todos los experimentos realizados; donde la mayor concentración siempre fue para la fracción del anillo, pero es importante considerar que la concentración espermática utilizada fue elevada (160×10^6 espermatozoides/ml) y que el porcentaje de recuperación para las células enriquecidas con cromosoma Y fue de 9.40 millones/ml, de esta manera solo se está recuperando el 6% de los espermatozoides depositados.

Hasta el momento la mayoría de las investigaciones que han evaluado la centrifugación en gradiente de densidad para el sexado, empleando distintos medios para su preparación, han reportado el enriquecimiento de espermatozoides con cromosoma X en el botón del tubo o pellet, con una confianza $\pm 70\%$, mientras que para los espermatozoides con cromosoma Y, recuperados del sobrenadante, tienen un porcentaje de enriquecimiento del $\pm 65\%$; siendo validados por distintas técnicas, tales como hibridación *in situ* [112], PCR-tr [2] [113], o a través de la inseminación *in vitro* [114]. En este estudio el enriquecimiento de espermatozoides con cromosoma Y se obtuvo en la fracción denominada capa superior, mientras que los espermatozoides con cromosoma X se encontraron distribuidos en menor proporción en las demás fracciones recuperadas. La densidad para el gradiente discontinuo que se empleó en este estudio fue 1.070 g/ml 10.071 g/ml, 1.072 g/ml (logrado con la mezcla de Ficoll-diatrizoato de sodio) y contrario a lo reportado por Harvey[5] y a lo esperado, este no permitió el enriquecimiento de los espermatozoides con cromosoma X en la pastilla. Cabe señalar que lo anterior posiblemente se debió a que la fracción de anillo probablemente pudo haber actuado como una especie de “filtro” para el paso de este tipo de espermatozoides, ya que esta fue la fracción que presentó la mayor concentración de espermatozoides. Como se sabe, debido a la diferencia que existe entre el contenido de DNA, el espermatozoide con cromosoma X es más grande que el espermatozoide Y [115] y dada esta diferencia, los espermatozoides con cromosoma Y pudieron pasar las diferentes densidades del gradiente empleado, mientras que los espermatozoides con cromosoma X pudieron ver obstaculizada su migración debido a su mayor tamaño, por lo tanto esta especie de “filtro” pudo haber influenciado la formación de las diferentes fracciones generadas por el gradiente empleado. Freifelder menciona que al haber una concentración

mayor de las partículas a separar en el gradiente de densidad, las moléculas comienzan a chocar entre sí, ocupando un volumen efectivo de la disolución realmente grande y cuando se aproximan entre sí, es más difícil para las moléculas del disolvente moverse en dirección opuesta y por lo tanto, se interfiere con la sedimentación [116]. En la presente investigación la concentración de los espermatozoides fue de 160×10^6 células/ ml; en algunos trabajos donde emplean los gradientes de densidad, reportan la utilización de 40 ó 50×10^6 espermatozoides/ ml [113] [117, 118] lo que permite tener una mejor distribución de los espermatozoides sobre el tubo, además el uso de distintas densidades para generar un gradiente de densidad favorece una mejor distribución y enriquecimiento de los espermatozoides [119] por lo que para estudios futuros se propone disminuir la concentración espermática utilizada para obtener un mejor resultado y para optimizar la muestra ya que para los programas de Inseminación Artificial el porcentaje de células sexadas recuperadas es de gran interés, debido al uso de dosis reducidas de semen sexado permite aprovechar mejor el semen, en particular en la especie ovina se han reportado el uso de dosis con 1, 5 y 15×10^6 espermatozoides / ml, así esto permite evaluar el potencial fertilizante a través de la inseminación artificial o sobre técnicas *in vitro* [103].

Otra posible explicación, es que ello también pudo haberse debido a diferentes densidades del medio pudieron haberse mezclado por un fenómeno de fluctuación, lo cual ocurre por efecto de la temperatura; si aumenta la temperatura la densidad de una disolución disminuye y estas fluctuaciones crearán inversiones locales en la densidad (regiones de alta densidad encima de otras de baja densidad) lo que se traducirá en un flujo local de líquido, lo cual se conoce con el nombre de convección [116].

Asimismo, un espermatozoide con cromosoma Y al ser más ligero puede nadar mucho más rápido que el espermatozoide X [28], ya que tiene la habilidad de migrar sobre un medio viscoso por lo que dicha característica pudo generar que el espermatozoide con cromosoma Y pudiera nadar hacia arriba de la superficie del gradiente ([120]).

Adicionalmente, Lomote (2009) menciona que al centrifugar una muestra se genera un ligero aumento en la temperatura, lo cual puede favorecer aglutinación o agregados de las partículas a centrifugar, lo que puede generar una disminución en el rendimiento de la muestra; sí se logra mantener una temperatura baja (4°C) al momento de la centrifugación, se disminuye la velocidad de agregación, sin embargo es necesario prolongar el tiempo de separación. Por su parte Kanesharatnam [121], menciona que una temperatura de 18°C sobre un gradiente de densidad muestra resultados óptimos para tener un balance entre el tiempo y el rendimiento de la muestra, mientras que otros autores sugieren que utilizar una temperatura de 22°C [113, 117] o de 22°-24°C [122], lo cual ayuda a contrarrestar este fenómeno de convección [116].

En este experimento no se utilizó una centrifuga con temperatura controlada, pero después al valorar la densidad del gradiente tras ser centrifugado (sin muestra) empleando las mismas condiciones que para el sexado, se encontró que la densidad del medio fue de 1.0547 g/ml (datos no mostrados).

Por otro lado, si bien en la presente investigación las densidades generadas (1.070, 1.071 y 1.072 g/ml) fue por el ajuste de una solución “stock” (Ficoll al 8% y diatrizoato al 32.8% con densidad aparente de 1.077 g/ml) basada en investigaciones anteriores [2], esto no

influyó en la repetitividad de los resultados, sin embargo en un futuro será necesario verificar las densidades de las soluciones, o de no ser así, es recomendable utilizar soluciones comerciales en donde previamente las densidades ya han sido estandarizadas. También es recomendable que ambos componentes, para generar el gradiente, se disuelvan por agitación, durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente, se filtren y conserven en un envase color ámbar para protegerlos de la luz y mantenerse a 4°C [47]; es decir, deberá tener un periodo de equilibrio.

Además, las densidades utilizadas en este trabajo se basaron en lo reportado por Harved [5] quién utilizó espermatozoides de humano y como se sabe, la densidad de una partícula tiene relación directa con el tamaño y la forma [116]; en el espermatozoide el tamaño y la forma pueden variar entre especies, siendo el espermatozoide de humano más pequeño que el espermatozoide de borrego; por lo cual no se descarta que estas variables pudieran haber influido directamente con la forma de la distribución del gradiente, ya que en cuanto más largo sea el objeto o la partícula, mayor será su resistencia al movimiento, generando así mayor coeficiente de fricción [116]. Por lo tanto, debe considerarse realizar el cálculo de la densidad y masa del espermatozoide de ovino, para así determinar su densidad aparente y poder realizar otros ajustes al gradiente de densidad a emplear.

Otros estudios empleando espermatozoides de bovino, en donde utilizan entre 10 y 12 capas para formar el gradiente, empleando una solución de Percoll™ y Optiprep® con densidades entre 1.010 y 1.123 g/ml, obtienen 62.0% y 47.3%, respectivamente, de enriquecimiento de espermatozoides con cromosoma X, mientras que Lucio al utilizar también Percoll™ y densidades similares, pero empleando solo tres capas para formar el

gradiente de densidad, obtiene 45.2% de enriquecimiento de espermatozoides X, estos últimos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio [117].

Cabe mencionar que en este estudio la proporción de espermatozoides con cromosoma Y en los controles fue de 61% y para los espermatozoides X del 39%. James, menciona que naturalmente la proporción de sexos tiende a mantener una proporción 50:50 [123] debido a este fundamento, se decidió revisar los registros de los últimos 3 años de los sementales utilizados para verificar la proporción del sexo de las crías, lo que confirmó que esta proporción tendió a homogenizarse con los años en la población evaluada (datos no mostrados). Lo cual coincide con lo señalado por Kruuk, quien menciona que muchas poblaciones de mamíferos al nacimiento muestran un cambio tendiente a equilibrar el sexo de la población cuando hubo una desviación debido diversos factores que influyen en este parámetro [124].

En el caso de la especie bovina, Chandler, reportó haber encontrado una mayor frecuencia en el porcentaje de espermatozoides con cromosoma Y en los eyaculados de algunos machos, relacionado con la frecuencia en el régimen de colección del semen, además menciona que el número total de espermatozoides en los eyaculados disminuyó hasta 73% cuando se comparó con la frecuencia de colección de una vez semana y por día [125]. En este estudio, los sementales se trabajaron por un periodo de 3 meses, colectándolos 3 veces por semana lo cual pudiera relacionarse con los resultados obtenidos con este autor. En el caso del carnero, se han identificado diferencias fisiológicas, tanto en los eyaculados entre machos como entre los mismos eyaculados de un macho, generando así variaciones en la fertilidad, lo cual tiene un efecto directo con su potencial biológico [70]. Asimismo, los

eyaculados tienden a ser muy heterogéneos en su población, teniendo una distribución normal [126] y esta heterogeneidad tanto en los machos como en los eyaculados tiene una influencia en la calidad de este. En este estudio, al evaluar si existía una relación entre los machos utilizados y la tendencia al enriquecimiento de los espermatozoides Y distribuidos a través de las distintas fracciones, se encontró que los machos utilizados no influyeron sobre el enriquecimiento de espermatozoides ($p > 0.05$), al igual que la raza de los animales empleados. Lo anterior sugiere que el enriquecimiento de los espermatozoides de ovino dependió solo del gradiente utilizando Ficoll-diatrizoato de sodio.

Ahora bien, la concentración espermática promedio de los eyaculados recién obtenidos fue ligeramente menor a lo reportado para la especie [127], esto puede deberse a que las muestras se tomaron hacia el final de la época reproductiva. Como se sabe, el fotoperiodo, particularmente en los pequeños rumiantes, puede modificar las características de los eyaculados, viéndose afectada la calidad con la época del año [126]. Respecto a esto se ha observado que en algunos carneros, se produce un mayor número de espermatozoides en otoño que en primavera, por lo cual varía el tamaño del testículo así como el número de espermatozoides producidos por gramo de testículo [128], así en primavera se reduce un 50% la producción espermática, ya que se genera una regresión del tejido glandular y una disminución en la producción de andrógenos [129]. Además, en el caso de la especie ovina pueden existir variaciones individuales entre machos y entre razas [128].

Por otro lado, el uso de Ficoll y diatrizoato de sodio como medio para sexar espermatozoides, permitió mantener la viabilidad espermática por arriba del 90% en las distintas fracciones generadas por el gradiente, posiblemente esto se deba a que

proporciona una osmolaridad fisiológica y una baja viscosidad lo que permite mantener un ambiente favorable para los espermatozoides [47]. En otros experimentos donde se emplean los gradientes de densidad para el sexado de espermatozoides de bovino también han obtenido una buena viabilidad, por lo que es considerado un método suave con las células [113, 117].

Además, la viabilidad espermática está altamente correlacionada con la función mitocondrial [130], en este estudio la evaluación realizada para la integridad mitocondrial en las distintas fracciones generadas por el gradiente, mostró una media ligeramente menor para mitocondrias integras en la fracción superior, mientras que para la fracción de anillo fue mayor, pero el valor para este parámetro fue disminuyendo progresivamente en las fracciones más profundas. A pesar, de la disminución paulatina de la viabilidad mitocondrial a través de las fases del gradiente, la proporción de espermatozoides con mitocondrias integras fue adecuada, lo que sugiere que el gradiente de densidad realiza una buena separación en base a la funcionalidad y viabilidad [131].

En relación a los patrones obtenidos para evaluar la viabilidad mitocondrial, Flores al emplear MitoTracker para evaluar el estado de la mitocondria en el espermatozoide del verraco, clasifica de forma semisubjetiva la intensidad de fluorescencia en la pieza media de los espermatozoides como alta y baja [109]; Garner al utilizar Rodamina 1,2,3, JC-1 y Mitotracker en espermatozoides de bovino, describe tres patrones de fluorescencia [75], lo cual coincide con los encontrados en este estudio (Figura 2), Además, Silva menciona que la ausencia de fluorescencia en la pieza media del espermatozoide es indicativo de que el gradiente de protones en las mitocondrias ha colapsado y en consecuencia la producción

aeróbica de ATP ha cesado, por lo tanto un espermatozoide no fluorescente no contiene mitocondrias funcionales, mientras que una fluorescencia completa de la pieza media en las células es aerobicamente funcional; si un espermatozoide tiene una fluorescencia incompleta o parcial en la pieza media, estos espermatozoides presentan una pobre despolarización de la membrana mitocondrial interna [91]. De esta manera, el observar este patrón en los espermatozoides se consideraron como “poco funcionales o próximos a morir” por no presentar una integridad mitocondrial completa.

Adicionalmente, la integridad mitocondrial no solo está relacionada con la viabilidad sino también con la motilidad, ya que la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en estos organelos es una de las fuentes principales de ATP necesaria para proporcionar la motilidad al espermatozoide [130]. En este estudio las muestras antes del sexado presentaron una motilidad aceptable (80%), sin embargo, no se realizó la evaluación de este parámetro después del sexado. En trabajos anteriores empleando la misma metodología del presente estudio y la misma especie se observó un porcentaje del 10-20% de motilidad en los espermatozoides [11] y cabe mencionar que en ese estudio la evaluación se realizó a temperatura ambiente y con solución amortiguadora de fosfatos; en futuros trabajos se deberá evaluar este parámetro para ver como incide sobre este en el proceso de sexado por el gradiente utilizado.

Ahora bien, el mismo comportamiento observado en la evaluación mitocondrial en relación a la integridad acrosomal fue observado, es decir, en la fracción superior un promedio mayor de acrosomas intactos, mientras que para las demás fracciones estos promedios fueron disminuyendo paulatinamente, aumentando los demás estados acrosomales; lo cual

puede ser explicado de la misma forma que para la mitocondria. Por otro lado, la integridad acrosomal es crucial para una fertilización exitosa tanto *in vitro* como *in vivo* [132], siendo la reacción acrosomal un fenómeno tiempo dependiente que no puede llevarse a cabo prematuramente o demasiado tarde, ya que una reacción acrosomal prematura genera fallas en la fertilización [133].

Los patrones de fluorescencia encontrados en este trabajo con los espermatozoides de ovino, se han reportado también en otras especies, como en el bovino [134] y el humano [135]. Si asociamos que la evaluación del estado acrosomal nos brinda información acerca de la capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide, la cual es útil para evaluar la fertilidad, la presencia de una fluorescencia intensa en el acrosoma es indicativo de una estructura intacta y la falta de ésta es indicativa de una pérdida o de una reacción acrosomal; la fluorescencia irregular o una banda ecuatorial, indica signos de desorganización o inicio de la reacción acrosomal. Sin embargo, en muchas ocasiones la pérdida del acrosoma se debe en medida a la manipulación de la muestras [91].

En base en los resultados obtenidos en este estudio, cabe mencionar que el gradiente nos permitió obtener espermatozoides con cromosoma Y con una mejor calidad espermática tanto mitocondrial como integridad acrosómica en la fracción superior del gradiente por lo que esto nos permite obtener espermatozoides de mejor calidad, ahora si bien valdría la pena en futuros estudios, realizar una selección de estos espermatozoides para ser sometidos nuevamente al gradiente de densidad para permitir enriquecerlos aún mejor.

Por otro lado, en las muestras sexadas al descongelado, de manera particular, la viabilidad espermática fue adecuada comparable con el control; en el caso del bovino, en diversos experimentos donde utilizan gradientes de Percoll™ reportan alrededor del 20 al 50% de viabilidad espermática al descongelado, valorado a través de la fertilización *in vitro* [136]. Cuando es utilizada la citometría de flujo para el sexado, se reporta en muestras al descongelado 70% en la viabilidad espermática [137] y un 86.8% en la integridad acrosomal, pero esto tras haber utilizado un gradiente de sílica después del proceso de sexado, la cual es empleado para retirar espermatozoides dañados o muertos, esto con el fin de obtener solo espermatozoides motiles y viables [138]. En este trabajo, no se realizó esta selección pero aun así el porcentaje de viabilidad fue mejor. Ahora bien, por otra parte, la baja motilidad observada tanto en el control como en muestras sexadas posiblemente se debió a que las muestras se resuspendieron en un medio normalmente empleado para semen fresco, como se sabe al ser sometido el semen a los procesos de sexado y de congelación, el metabolismo de las células disminuye por lo que es recomendable re-suspenderlos en un medio que les proporcione nutrientes y una adecuada fuente de energía para de esta manera tratar de protegerlos [139]. Se ha visto que el uso del medio Tris modificado proporciona mejores condiciones de longevidad al congelado-descongelado de las muestras, al igual que para el proceso de sexado [108], así como el Androhep® (Minitübe), que es otro medio que mantiene la eficiencia tanto en el sexado, como en la motilidad progresiva al descongelado, mantenido la función espermática después del sexado, durante la congelación y descongelación [140].

La evaluación de la integridad mitocondrial de los espermatozoides sexados al descongelado no mostró una diferencia significativa con el control. Flores reportó, en espermatozoides de cerdo al descongelado, un daño mitocondrial de 71.4%, proponiendo que el daño pudo deberse a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el proceso de congelación lo cual puede verse asociado a una disminución de la actividad mitocondrial [109], además de los fenómenos como el cambios de temperatura, choque frío y cambios osmóticos asociados a el proceso del congelado-descongelado, siendo estos factores los más importantes que explican la muerte celular durante la congelación-descongelación [141].

La integridad acrosomal en las muestras sexadas descongeladas, tampoco se vio afectada, incluso no se encontraron espermatozoides con reacción acrosomal, tanto en el control como en el semen sexado; es decir a pesar del daño que se genera por la congelación, se logró mantener un número considerable de espermatozoides con acrosoma integro. Resende menciona que el usar un gradiente de densidad como método de sexado permite recuperar espermatozoides con un menor daño en el acrosoma y en la membrana plasmática [113] por lo que, al utilizar este tipo de método garantiza la viabilidad del espermatozoide [142].

Se ha señalado que la congelación genera factores estresantes tanto mecánicos como químicos para la superficie espermática, por lo que diversas proteínas se distribuyen de la región sub ecuatorial hacia el ecuador del espermatozoide después de ser sometidos a un proceso de sexado y que dicha reubicación refleja cambios ligados a la capacitación sobre la membrana espermática [94], así como distintos efectos sobre los lípidos de la membrana, cambios de volumen, entre otros. En este trabajo, la evaluación de la integridad acrosomal

en los espermatozoides sometidos a congelación no se vieron drásticamente afectados por este fenómeno.

En el caso del sexado por citometría de flujo, se reporta un daño acrosomal del 65% en espermatozoides de bovino al descongelado, ello a pesar de haber realizado una selección previa de espermatozoides viables [143].

Finalmente, si bien el sexado por citometría de flujo se realiza de manera comercial, en nuestro caso se necesitó de un tiempo largo de estandarización del equipo, por lo que el proceso presenta limitantes, ya que en el caso particular de los espermatozoides se requiere de un aparato especializado que realice “sorting celular” que cuente con un láser violeta para excitar al fluorocromo a utilizar, una boquilla que presente una orientación de 90° para poder direccionar mejor a los espermatozoides [144], un fluido interno a base de TRIS (BSA, Tris, antibióticos, citrato de sodio y ácido cítrico) [53], para con ello generar una presión interna de 40 a 50 psi y para poder incrementar la supervivencia de los gametos a separar [18], así como un entrenamiento del operador. Dadas estas limitantes, no se pudo realizar una separación celular para poder comparar ambas técnicas de sexado, solo se realizó un análisis piloto para la separación de espermatozoides de ovino (datos no mostrados) obteniendo 75% de pureza para espermatozoides con cromosoma Y y 25% para espermatozoides con cromosoma X, pero deberán realizarse las diversas pruebas que verifiquen la capacidad fertilizante de los espermatozoides, así como la obtención de un mayor número de muestras.

Cabe mencionar, que la Compañía Sexing Technologies™ mantiene la patente para el sexado de espermatozoides de bovino, desde el 2003 (<http://www.sexingtechnologies.com/>)

Por lo pronto, en un futuro vale la pena seguir evaluando e integrando conocimientos para el uso de esta herramienta, para ser utilizada como un complemento en diversas investigaciones en la Medicina Veterinaria o formar parte de la red de usuarios de esta tecnología, resaltándose el hecho de que el uso de la centrifugación en gradiente de densidad seguirá siendo un método de bajo costo, suave con las células y que permite mantener una buena viabilidad en los espermatozoides de ovino, y que puede lograr un enriquecimiento de las poblaciones espermáticas deseadas; siempre y cuando se tomen en cuentas las características particulares de la especie, así como las variables físico-químicas que llevan consigo el fenómeno de centrifugación y que hoy en día puede tener una interesante aplicación en las llamadas “nuevas tecnologías asistidas” en la reproducción de los ovinos, pudiendo representar un menor costo en la producción animal de un sexo en particular [121], por lo tanto se deben realizar aún diversas modificaciones para la estandarización de la técnica, ya que no solo puede ser utilizada para la especie ovina, sino para cualquier especie.

CONCLUSIONES

En este trabajo, se obtuvo un enriquecimiento del 70% de espermatozoides con cromosoma Y del semen ovino, después de utilizar el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio validado por citometría de flujo, manteniendo no solo una buena viabilidad espermática durante todas las fases experimentales, sino que además permitió realizar una selección de los espermatozoides por funcionalidad al haber sido evaluados por integridad acrosomal y mitocondrial. Por otro lado, pese al daño que se produce por la congelación y después de haber sido sometidos a un proceso de sexado los resultados muestran que las células no se ven afectadas de manera drástica por este fenómeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cruz A., *Evaluación de la eficiencia de un equipo de citometría de flujo y dos fluorocromos para el sexado de semen congelado en bovinos*, in FMVZ, UNAM, 2005.
2. Vazquez, A., *Sexaje de espermatozoides de bovino mediante centrifugación en gradientes de densidad*, in *Tesis de Licenciatura*, UNAM-FMVZ, 2008.
3. 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.
4. Windsor, D.P., G. Evans, and I.G. White, *Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review*. *Reprod Fertil Dev*, 1993. **5**(2): p. 155-71.
5. Harvey, E.N., *Can the sex of mammalian offspring be controlled?* *J Hered*, 1946. **37**: p. 71-3.
6. Harvey E.B ., *Parthenogenetic merogony of cleavage without nuclei in *arbacia punctulata**. *Biological bulletin*, 1936. **71**(1): p. 101-121.
7. Lush, J.L., *The possibility of sex control by artificial insemination with centrifuged spermatozoa*. *J Agric Res*, 1925. **30**(10): p. 893-913.
8. Painter, T.S., *Studies in mammalian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man*. *Journal of Experimental Zoology*, 1923. **37**(3): p. 291-336.
9. Tejeda A., M.R., Guzmán R., *Bioseparaciones*, Unison, Editor 1995: Hermosillo, Sonora.
10. López, L.G.U., *Valoración de la eficiencia de la centrifugación en gradientes de densidad para el sexado de espermatozoides sobre el sexado de crías en ovinos*, in FMVZ 2010, UNAM.
11. Rojas NYG., *Centrifugación de semen de ovino en Ficoll-diatrizoato de sodio para su sexado y uso en la Inseminación Artificial*, in FMVZ, 2011, UNAM.
12. Johnson, L.A. and G.R. Welch, *Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency*. *Theriogenology*, 1999. **52**(8): p. 1323-41.
13. Garner, D.L., *Flow cytometric sexing of mammalian sperm*. *Theriogenology*, 2006. **65**(5): p. 943-57.
14. Seidel, G.E., Jr., *Sexing mammalian sperm--intertwining of commerce, technology, and biology*. *Anim Reprod Sci*, 2003. **79**(3-4): p. 145-56.
15. Hohenboken, W.D., *Applications of sexed semen in cattle production*. *Theriogenology*, 1999. **52**(8): p. 1421-33.
16. Seidel, G.E., Jr. and D.L. Garner, *Current status of sexing mammalian spermatozoa*. *Reproduction*, 2002. **124**(6): p. 733-43.
17. Hollinshead, F.K., et al., *In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing*. *Reprod Fertil Dev*, 2003. **15**(6): p. 351-9.
18. Suh, T. and J. Schenk, *Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics*. *Theriogenology*, 2003. **59**(1): p. 516.
19. Michael, A., et al., *Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa*. *Theriogenology*, 2007. **68**(2): p. 204-12.
20. Schenk, J.L., et al., *Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa*. *Theriogenology*, 1999. **52**(8): p. 1375-91.

21. de Graaf, S.P., et al., *Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation*. Theriogenology, 2008. **70**(8): p. 1360-3.
22. Gamble, T. and D. Zarkower, *Sex determination*. Curr Biol, 2012. **22**(8): p. R257-62.
23. Mittwoch, U., *Three thousand years of questioning sex determination*. Cytogenet Cell Genet, 2000. **91**(1-4): p. 186-91.
24. Lesky, E., *Die zeugungs-und vererbungslehren der antike und ihr nachwirken* 1951: Verlag der Akademie der Wissenschaften und der Literatur.
25. Cole, F.J., *Early theories of generation*, O. Press, Editor 1930: The carendon.
26. Liddell S.J., *Etimologías griegas*. novena edición, 1989.
27. Hernández VD, M.L., *Bases moleculares de la determinación sexual en mamíferos*. Ciencia Ergo Sum, 2008. **15**(3): p. 287-296.
28. Jafar, S.I. and A.P. Flint, *Sex selection in mammals: a review*. Theriogenology, 1996. **46**(2): p. 191-200.
29. Palma G.A., *Bioteconologías de la reproducción*, E.I.N.d.T. Agropecuaria, Editor 2001. p. 343-347.
30. Gordon, M.J., *Control of Sex Ratio in Rabbits by Electrophoresis of Spermatozoa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1957. **43**(10): p. 913-8.
31. Ericsson, R.J., C.N. Langevin, and M. Nishino, *Isolation of fractions rich in human Y sperm*. Nature, 1973. **246**(5433): p. 421-4.
32. Pearson, P.L., M. Bobrow, and C.G. Vosa, *Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei*. Nature, 1970. **226**(5240): p. 78-80.
33. Steeno, O., A. Adimoelja, and J. Steeno, *Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa with the sephadex gel-filtration method*. Andrologia, 1975. **7**(2): p. 95-7.
34. Hare, W.C.D. and K.J. Betteridge, *Relationship of embryo sexing to other methods of prenatal sex determination in farm animals: A review*. Theriogenology, 1978. **9**(1): p. 27-43.
35. Moruzzi, J.F., *Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa*. J Reprod Fertil, 1979. **57**(2): p. 319-23.
36. Maxwell, W.M., et al., *Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox*. Anim Reprod Sci, 2004. **82-83**: p. 79-95.
37. G.S., R., *Bioteconología reproductiva: Avances en ganado bovino*. Veterinaria México, 1993. **24**(3): p. 177-184.
38. Zoheir, K.M. and A.A. Allam, *A rapid method for sexing the bovine embryo*. Anim Reprod Sci, 2010. **119**(1-2): p. 92-6.
39. O'Brien, J.K., et al., *Flow cytometric sorting of non-human primate sperm nuclei*. Theriogenology, 2005. **63**(1): p. 246-59.
40. Parati, K., et al., *Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR*. Theriogenology, 2006. **66**(9): p. 2202-9.
41. Kaneko, S., et al., *Separation of human X- and Y-bearing sperm using percoll density gradient centrifugation*. Fertil Steril, 1983. **40**(5): p. 661-5.
42. Iizuka, R., et al., *Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application*. Hum Reprod, 1987. **2**(7): p. 573-5.
43. Schewiderski H, B.S., Chwerin M., *Mikroinjektion und vitro befruchtung mit spermien aus versuchen zur anreicherung de geschlechtsspezifischen spermien y pen beim rind Dom*. Anim, 1991. **26**: p. 143-144.

44. Hossepian de Lima, V.F., *Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal*. Revista Brasileira de Zootecnia, 2007. **36**: p. 219-228.
45. Hossepian de Lima, V.F., *Separation of X and Y bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation*. Theriogenology, 2000. **53**: p. 280.
46. Chávez GA., *determinación de la viabilidad e integridad de el semen bovino sexado mediante centrifugación por densidad den gradientes con Ficoll-diatrizoato de sodio antes y después de la criopreservación*, in FMVZ2011, UNAM.
47. Lomonte B., *Técnicas de laboratorio en Inmunología clínica*, U.d.C. Rica, Editor 2009. p. 122.
48. Michael, R.S.a.l., *Principles and applications of flow cytometry*. 2005.
49. Pinkel, D., et al., *Sex preselection in mammals? Separation of sperm bearing Y and "O" chromosomes in the vole *Microtus oregoni**. Science, 1982. **218**(4575): p. 904-6.
50. Garner, D.L. and G.E. Seidel, Jr., *History of commercializing sexed semen for cattle*. Theriogenology, 2008. **69**(7): p. 886-95.
51. Seidel, G.E., Jr., *Overview of sexing sperm*. Theriogenology, 2007. **68**(3): p. 443-6.
52. Haugland RP., *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. octava edición, editorial Eugenia, 2001.
53. O'Brien, J.K., et al., *Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates*. Reprod Fertil Dev, 2003. **15**(7-8): p. 367-75.
54. Jonhson LA., *Isolation of X and Y bearing sperm for sex preselection*, p.O.U. Oxford University, Editor 1994. p. 303-306.
55. Maxwell, W.M. and L.A. Johnson, *Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation*. Mol Reprod Dev, 1997. **46**(3): p. 408-18.
56. de Graaf, S.P., et al., *Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule*. Theriogenology, 2009. **71**(1): p. 89-97.
57. Cox, J.F., et al., *Differences in sperm migration through cervical mucus in vitro relates to sperm colonization of the oviduct and fertilizing ability in goats*. Theriogenology, 2002. **58**(1): p. 9-18.
58. Maxwell, W.M., et al., *Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility*. Soc Reprod Fertil Suppl, 2007. **64**: p. 13-38.
59. McClean, R.V., W.V. Holt, and S.D. Johnston, *Ultrastructural observations of cryoinjury in kangaroo spermatozoa*. Cryobiology, 2007. **54**(3): p. 271-80.
60. Gillan, L., W.M. Maxwell, and G. Evans, *Preservation and evaluation of semen for artificial insemination*. Reprod Fertil Dev, 2004. **16**(4): p. 447-54.
61. Beilby, K.H., et al., *The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm*. Theriogenology, 2009. **71**(5): p. 829-35.
62. Eddy, E.M., *In the physiology of reproduction*. 1988.
63. Carra, E., et al., *Male infertility and mitochondrial DNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(1): p. 333-9.
64. Rodriguez-Gil, J.E., *Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration*. Reprod Domest Anim, 2006. **41** Suppl 2: p. 11-20.
65. Peña, F.J., et al., *Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review*. Reprod Domest Anim, 2009. **44**(2): p. 345-9.

66. Luo, S.M., H. Schatten, and Q.Y. Sun, *Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go?* J Genet Genomics, 2013. **40**(11): p. 549-56.
67. Otani, H., et al., *Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: regular dispositions and synchronized changes.* Anat Rec, 1988. **222**(1): p. 26-33.
68. Yang, M., et al., *Coevolution study of mitochondria respiratory chain proteins: toward the understanding of protein--protein interaction.* J Genet Genomics, 2011. **38**(5): p. 201-7.
69. Bunch, D.O., et al., *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis.* Biol Reprod, 1998. **58**(3): p. 834-41.
70. Windsor, D.P., *Mitochondrial function and ram sperm fertility.* Reprod Fertil Dev, 1997. **9**(3): p. 279-84.
71. Del Olmo, E., et al., *Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity.* Anim Reprod Sci, 2013.
72. Ruiz-Pesini, E., et al., *The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process?* Curr Top Dev Biol, 2007. **77**: p. 3-19.
73. Liesa, M., M. Palacin, and A. Zorzano, *Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease.* Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 799-845.
74. Gravance, C.G., et al., *Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function.* Reprod Toxicol, 2001. **15**(1): p. 5-10.
75. Garner, D.L., et al., *Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.* Biol Reprod, 1997. **57**(6): p. 1401-6.
76. Mukai, C. and M. Okuno, *Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement.* Biol Reprod, 2004. **71**(2): p. 540-7.
77. Sandro C, E., Sidney V, Jr., *relationship of in vitro acrosome reaction to sperm function:an update.* the open reproductive science journal, 2011. **3**: p. 72-84.
78. Flesch, F.M. and B.M. Gadella, *Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1469**(3): p. 197-235.
79. Bedford, J.M., *Sperm capacitation and fertilization in mammals.* Biol Reprod, 1970. **2**: p. Suppl 2:128-58.
80. Mendoza, C., et al., *Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using Pisum sativum agglutinin.* J Reprod Fertil, 1992. **95**(3): p. 755-63.
81. Kilani, Z., et al., *Evaluation and treatment of familial globozoospermia in five brothers.* Fertil Steril, 2004. **82**(5): p. 1436-9.
82. Suri, A., *Contraceptive vaccines targeting sperm.* Expert Opin Biol Ther, 2005. **5**(3): p. 381-92.
83. Gutierrez, A., et al., *Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an in vitro model for the study of capacitation and the acrosome reaction.* Mol Reprod Dev, 1993. **36**(3): p. 338-45.
84. Graham, J.K., R.H. Foote, and S.R. Hough, *Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion, and boar.* Biol Reprod, 1987. **37**(1): p. 181-8.
85. Valcarcel, A., et al., *Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining.* Anim Reprod Sci, 1997. **45**(4): p. 299-309.

86. Marti, J.I., J.A. Cebrian-Perez, and T. Muino-Blanco, *Assessment of the acrosomal status of ram spermatozoa by RCA lectin-binding and partition in an aqueous two-phase system*. J Androl, 2000. **21**(4): p. 541-8.
87. Magargee, S.F., E. Kunze, and R.H. Hammerstedt, *Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation*. Biol Reprod, 1988. **38**(3): p. 667-85.
88. Jimenez, I., et al., *Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa*. Theriogenology, 2003. **59**(5-6): p. 1171-80.
89. Graham, J.K., *Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach*. Anim Reprod Sci, 2001. **68**(3-4): p. 239-47.
90. Topfer-Petersen, E., et al., *Ultrastructural localization of lectin binding sites of the acrosomal membrane system of boar spermatozoa*. Andrologia, 1984. **16**(6): p. 538-47.
91. Silva, P.F. and B.M. Gadella, *Detection of damage in mammalian sperm cells*. Theriogenology, 2006. **65**(5): p. 958-78.
92. Esteves, S.C., et al., *Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test*. Int Braz J Urol, 2007. **33**(3): p. 364-74; discussion 375-6.
93. Esteves, S.C., et al., *Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate*. Hum Reprod, 1998. **13**(12): p. 3384-9.
94. Leahy, T., et al., *High pre-freezing dilution improves post-thaw function of ram spermatozoa*. Anim Reprod Sci, 2010. **119**(1-2): p. 137-46.
95. Maxwell, W.M., *Current problems and future potential of artificial insemination programmers*. Reproduction in sheep, 1984: p. 291-298.
96. Hammerstedt, R.H., J.K. Graham, and J.P. Nolan, *Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive*. J Androl, 1990. **11**(1): p. 73-88.
97. Peris, S.I., et al., *Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay*. J Androl, 2004. **25**(2): p. 224-33.
98. Gillan, L., G. Evans, and W.M. Maxwell, *Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa*. Reprod Fertil Dev, 1997. **9**(5): p. 481-7.
99. Salamon, S. and W.M.C. Maxwell, *Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination*. Anim Reprod Sci, 1995. **37**(3-4): p. 185-249.
100. Gillan, L., et al., *Fate and functional integrity of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination*. Reprod Fertil Dev, 1999. **11**(6): p. 309-15.
101. Johnson, L.A., *Gender preselection in mammals: an overview*. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1996. **103**(8-9): p. 288-91.
102. Seidel, G.E., Jr., et al., *Insemination of heifers with sexed sperm*. Theriogenology, 1999. **52**(8): p. 1407-20.
103. de Graaf, S.P., et al., *Successful low dose insemination of flow cytometrically sorted ram spermatozoa in sheep*. Reprod Domest Anim, 2007. **42**(6): p. 648-53.
104. Rath, D., et al., *Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects*. Reproduction, 2013. **145**(1): p. R15-30.
105. Simpson, A.M., M.A. Swan, and I.G. White, *Action of phosphatidylcholine in protecting ram sperm from cold shock*. Gamete Research, 1986. **15**(1): p. 43-56.

106. Mejía, OV, *Manejo de semen (fresco y congelado) e inseminación artificial en ovejas in Evaluación, dilución y congelación de semen ovino, FMVZ-UNAM, 2008.*
107. Suttiyotin, P. and C. Thwaites, *The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa.* Anim Reprod Sci, 1991. **25**(3): p. 209-224.
108. Evans G., M.W., *Inseminación artificial de ovejas y cabras.* 1990.
109. Flores, E., et al., *The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa.* Theriogenology, 2009. **72**(6): p. 784-97.
110. Szasz, F., et al., *Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen.* Mol Reprod Dev, 2000. **55**(3): p. 289-98.
111. Spiegel RM, S.L., *Estadística y probabilidad* 1991.
112. LANGE, W.P., H.; BLOTTNER, S. et al, *Über de einfluß des bullen auf die selective anreicherung der X-und Y- spermien mit der Percoll-dichtegradienten-zentrifugation.* Arch. Tierz., 1995. **38**: p. 155-161.
113. Resende, M.V., Lucio AC, Perine AP, Oliveira LZ, Almeida AO, Alves BCa, Moreira-Filho CA, Santos IW, Hossepian de Lima VFM, *Comparative validation using quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR pf bovine semen centrifuged in continuos density gradient.* Arq. Bras. Med. Vet Zootec, 2011. **63**(3): p. 544-551.
114. Vitória MR, M.B., Felipe P, Adriana OA, Costa LA, Vera FM, *Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuos Percoll and Optiprep density gradient effect in sperm viability and in vitro embryo production.* Ciencia animal Brasileira, 2009. **10**(2): p. 581-587.
115. Roberts, A.M., *Gravitational separation of X and Y spermatozoa.* Nature, 1972. **238**(5361): p. 223-5.
116. Freifelder DM., *Técnicas de bioquímica y biología molecular*, R. S.A, Editor 1991: España, Barcelona.
117. Lucio, A.C., Resende MV, Dernowseck-Meirelles JA, Peruni AP, Oliveira LZ, Miguel MCV, Carmo AS, Tomita SY, Alves BCA, Fazano FAT, lima VFMH, *Assessment of swim-up discontinuos density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production.* Arq. Bras. Med. Vet Zootec, 2012. **64**(3): p. 525-532.
118. Esmaeilpour T, E.L., Bahmanpour S, Gramadi A, Monabbati A. Dehgrani F. Kazeroom M., *Effect of combined density gradient centrifugation on X and Y sperm separation and chromatin integrity.* Iran Journal Reprod. Med., 2012. **10**(5): p. 435-440.
119. Hossepian de Lima, V.F., *Selecao do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugacao em gradiente de densidade.* Sao Paulo, Brazil, 1998.
120. Kirkman-Brown, J.C. and D.J. Smith, *Sperm motility: is viscosity fundamental to progress?* Mol Hum Reprod, 2011. **17**(8): p. 539-44.
121. Kanesharatnam N, e., Balasubramaniam K., *Fractionation of X and Y chromosome-bearing bovine spermatozoa through sugar gradients for sex predetermination in dairy cattle.* Inter. Journal of Bioscience, Biochemistry and bioinformatics, 2012. **2**(3).
122. Resende MV, B.M., Perecin AO, Almeida AO, Lucio AC, Hossepian de lima VFM, *Separation of X bearing bovine sperm by centrifugation in continuos percoll and Optiprep density gradient; effect in sperm viability and in vitro embryo production.* Ciencia animal Brasileira, 2009. **10**(2): p. 581-587.
123. James, W.H., *Hypotheses on the stability and variation of human sex ratios at birth.* J Theor Biol, 2012. **310**: p. 183-6.

124. Kruuk, L.E., et al., *Population density affects sex ratio variation in red deer*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 459-61.
125. Chandler, J.E., et al., *Collection frequency affects percent Y-chromosome bearing sperm, sperm head area and quality of bovine ejaculates*. Theriogenology, 2002. **57**(4): p. 1327-46.
126. Marti, J.I., et al., *Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates*. Theriogenology, 2012. **78**(3): p. 528-41.
127. Jiménez S.H., *Anatomía funcional del aparato reproductor del macho*, in *Fisiología Veterinaria e Introducción a la fisiología de los procesos productivos*, FMVZ-UNAM, Editor 2010. p. 481-507.
128. Galina C, V.J., *Reproducción de los animales domésticos*. 2008.
129. Thimonier, J., *Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones*. J Reprod Fertil Suppl, 1981. **30**: p. 33-45.
130. Turner, R.M., *Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation*. Reprod Fertil Dev, 2006. **18**(1-2): p. 25-38.
131. Mata CM, Á.R., Campillo L, Palacios AA, Fuentes C, Redondo BS, Alonso MJ, Martínez PF., *Estatus mitocondrial y producción de radicales superóxido tras la selección espermática por Androcoll de espermatozoides descongelados de ciervos y de ovino*. 2013: p. 398-400.
132. Esteves, S.C., Sidney V Jr. , *Relationship of in vitro acrosome reaction to sperm function: an update*. the open reproductive science journal, 2011. **3**: p. 72-84.
133. Tesarik, J. and C. Mendoza, *Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk*. Fertil Steril, 1995. **63**(1): p. 153-7.
134. Cross, N.L. and S.E. Hanks, *Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes*. Hum Reprod, 1991. **6**(9): p. 1279-83.
135. Mortimer, D., E.F. Curtis, and R.G. Miller, *Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon*. J Reprod Fertil, 1987. **81**(1): p. 127-35.
136. Thys, M., et al., *In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation*. Reprod Domest Anim, 2009. **44**(3): p. 390-4.
137. Johnson, L.A., et al., *Comparative flow cytometric sorting efficiency of X- and Y-chromosome bearing sperm from 40 bulls*. Theriogenology, 1997. **47**(1): p. 269.
138. Underwood, S.L., et al., *Development of procedures for sex-sorting frozen-thawed bovine spermatozoa*. Reprod Domest Anim, 2009. **44**(3): p. 460-6.
139. Salisbury GW, V.D.N., Ladge JR., *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos*. 1996.
140. Hollinshead, F.K., et al., *Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa*. Theriogenology, 2004. **62**(5): p. 958-68.
141. Holt, W.V., et al., *The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope*. Theriogenology, 2005. **63**(2): p. 370-82.
142. Oliveira, L.Z., et al., *Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association*. Andrologia, 2012. **44**(1): p. 9-15.

143. Rath, D., et al., *Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application*. Theriogenology, 2009. **71**(1): p. 22-9.
144. Pinkel, D., et al., *High resolution DNA content measurements of mammalian sperm*. Cytometry, 1982. **3**(1): p. 1-9.