



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS
ESPERMATOZOIDES SEXADOS DEL DELFÍN NARIZ DE
BOTELLA (*Tursiops truncatus*) MEDIANTE
CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD CON
FICOLL-DIATRIZOATO DE SODIO Y POR CITOMETRÍA DE
FLUJO.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
SALUD ANIMAL.**

PRESENTA:

ROCÍO ABIGAÍL FRAUSTRO CUEVAS

ASESOR:

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda (FMVZ)

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Santiago René Anzaldúa Arce (FMVZ)

Dr. Alejandro Córdova Izquierdo (UAM-X)

**Invitada: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano
(HE CMN SXXI IMSS)**



México, D.F. Agosto del 2015.



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.

DEDICATORIAS

A mis padres Luis y Laura por sus esfuerzos para formarme como individuo, así como el apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos Arturo, Adriana y Omar por siempre estar ahí, caminando juntos aún cuando estamos lejos.

A Brunito por dar siempre la energía y el amor más puro del universo, además de recordarme siempre sonreír.

A mis Tíos Lupita y Sergio por contribuir en lo que soy como persona.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PAPIIT IN215012 (DGAPA-UNAM).

A la Dra. Ma. Lourdes Juárez Mosqueda por su apoyo para la realización del trabajo.

A la Dra. Lourdes A. Arriaga Pizano por su paciencia y asesoría, pero principalmente por esa buena energía para transmitir su conocimiento y pasión por la citometría y en general por enseñarme a ver las cosas con una perspectiva diferente.

Al MVZ Roberto Sánchez Okrucky por la confianza y la libertad para realizar el proyecto.

Al MC MVZ Saúl Soto y a la MVZ María René Arreola por las todas facilidades otorgadas.

A la MVZ Elda Sotelo por el apoyo brindado durante toda la parte experimental del proyecto, que fue fundamental para la conclusión del mismo. Así como al staff de entrenadores por su apoyo para la obtención de las muestras, principalmente a la Biol. Adriana Barbosa por el interés en el trabajo y lograr el comportamiento.

A los miembros del jurado: Dr. José Alfredo Medrano Hernández, Dr. Oscar Gutiérrez Pérez, Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano y Dra. Ivonne Claudine Ducolomb Ramírez por todas sus observaciones para mejorar este trabajo.

A la MVZ Frida Salmerón Sosa y al M en C. Luis Ángel Flores Mejía por su asesoría para realizar el análisis estadístico.

Al M en C. Esteban Domínguez Cerezo por el apoyo durante todo el experimento para el procesamiento de muestras.

CONTENIDO

ÍNDICE	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE.....	IV
ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. GENERALIDADES.....	6
2.1 Anatomía Reproductiva del Macho	7
2.2 Madurez Sexual	9
2.3 Estudio del Comportamiento Animal.....	11
2.3.1 Condicionamiento Clásico o Pavloviano	12
2.3.2 Condicionamiento Operante	12
2.3.3 Colección de semen.....	13
III. ANTECEDENTES.....	15
3.1 Determinación sexual en mamíferos	16
3.2 Espermatozoide	17
3.2.1 Diferencia entre espermatozoides X y Y	18

3.2.1.1	Cuerpo F.....	18
3.2.1.2	Proteínas de Superficie.....	19
3.2.1.3	Motilidad	19
3.2.1.4	Tamaño y Forma.....	19
3.2.1.5	Contenido DNA	20
3.3	Métodos de sexado.....	21
3.3.1	Citometría de Flujo.....	21
3.3.1.1	Fluorocromos	24
3.3.1.1.1	Hoechst 3342	26
3.3.2	Centrifugación	27
3.3.2.1	Ficoll	31
3.3.2.2	Diatrizoato de Sodio.....	31
3.3.2.3	Optiprep®.....	31
3.4	Membrana Acrosomal.....	32
3.4.1	Lectinas	33
3.5	Mitocondrias	34
3.5.1	MitotrackerRed CMXRos®	35
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	35
V.	HIPÓTESIS	37
VI.	OBJETIVOS.....	37

6.1 Objetivo General	37
5.2 Objetivos Específicos.....	37
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	38
7.1 Sujetos de Estudio	38
7.2 Obtención y procesamiento de las muestras	39
7.3 Movilidad Total	39
7.4 Movilidad Progresiva.....	40
7.5 Concentración del Eyaculado	41
7.6 Evaluación del medio de transporte.....	41
7.7 Sexado por gradiente de densidad.....	42
7.8 Evaluación del sexado por gradiente de densidad mediante citometría de flujo	43
7.9 Sexado por citometría de flujo	44
7.10 Evaluación de las Muestras.....	45
7.10.1 Evaluación de la Integridad de Membrana.....	45
7.10.2 Evaluación de la Membrana plasmática y del acrosoma....	45
7.10.3 Evaluación de la Integridad Mitocondrial.....	47
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
IX. RESULTADOS.....	50
9.1 Evaluación de Medios de transporte	50

9.2 Evaluación de la Integridad de la membrana acrosomal.....	50
9.3 Evaluación de la Integridad Mitocondrial.....	52
9.4 Evaluación del sexado por gradientes de densidad mediante Citometría de Flujo.....	54
9.5 Sexado mediante citometría de flujo.....	57
X. DISCUSIÓN.....	58
XI. CONCLUSIONES.....	66
XII. REFERENCIAS.....	67

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the viability of the bottlenose dolphin sperm sexed by density gradient centrifugation and flow cytometry. In the first case, the commercial medium Optiprep® was employed in addition to the use of Ficoll-sodium diatrizoate density gradient.

Sperm were collected from a dolphin adult male (20 years old); a total of 20 ejaculates were collected using an artificial vagina and operant conditioning; 17 ejaculates were used for centrifugation and 3 for flow cytometry. To prepare the media for density gradient a mix of Ficoll at 8% and sodium diatrizoate at 32.8% was used. The density was 1.070g/ml this verified by a pycnometer; the commercial medium was prepared according to the manufacturer. Finally 160×10^6 sperm/ml was added to the surface gradient, the samples were centrifuged at 750rpm for 15 min at 18 °C. Total motility, progressive motility and concentration was assessed before and after treatment.

After centrifugation three fractions were obtained; in both gradients the percentage of spermatozoa X and Y in each fraction were evaluated by flow cytometry. The results show that a high percentage of sperm bearing X chromosome were in the fraction called F1 of the samples sexed by Ficoll-sodium diatrizoate density, which shows an enrichment of 67%. Sperm viability was not affected. For commercial gradient Optiprep® no enrichment was found in any of the fractions.

When performing sexing by flow cytometry enrichment of 84% for Y-chromosome bearing sperm and 90% for X was obtained, showing an acrosomal and mitochondrial integrity of 46.91% and 46.23% respectively.

In conclusion all the treatments had a significant effect on mitochondrial and acrosomal integrity of the sexed sperm, and even though the flow cytometry method was the best to separate of sperm populations, the density gradient of Ficoll- sodium diatrizoate was the best to maintain the cell viability.

RESUMEN

FRAUSTRO CUEVAS ROCÍO ABIGAÍL. “VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES SEXADOS DEL DELFÍN NARIZ DE BOTELLA (*Tursiops truncatus*) MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD CON FICOLL-DIATRIZOATO DE SODIO Y POR CITOMETRÍA DE FLUJO. (Bajo la dirección de Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad espermática de los espermatozoides del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) sometidos a dos procesos de sexado: centrifugación en gradientes de densidad y mediante citometría de flujo. En el primer caso, además del empleo del gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio se empleo el medio comercial Optiprep®. Se utilizaron 20 eyaculados, 17 para centrifugación y 3 para citometría de flujo, provenientes de un solo macho. Los resultados del sexado al emplear el Ficoll-diatrizoato de sodio mostraron una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la fracción 1 (F1) (67.06%) con respecto a su control (29.74%) y la fracción Anillo (Anillo) (33.99%) para espermatozoides con cromosoma X; los espermatozoides con cromosoma Y únicamente la fracción F1 (32.94%) fue diferente con respecto al control (64.75%) ($P \leq 0.05$). La integridad acrosomal fue de $76.25 \pm 1.68\%$ en el grupo control, $P \leq 0.05$ con respecto al resto de las fracciones, donde en F1 fue de $54.13 \pm 1.50\%$, sin diferencia entre fracciones. Los resultados obtenidos al valorar la integridad mitocondrial mostraron que la fracción F1 tuvo los valores más bajos ($53.84 \pm 0.57\%$) ($P \leq 0.05$) con respecto al control y las demás fracciones. Para el gradiente comercial Optiprep® el enriquecimiento para ambas poblaciones espermáticas no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre las fracciones,

obtenidas, mientras que la integridad acrosomal fue diferente ($P \leq 0.05$) en todas las fracciones en comparación con el control mostrando valores para la fracción F1 de $48.82 \pm 0.76\%$, Anillo de $42.20 \pm 1.36\%$ y la fracción F2 de $43.64 \pm 1.92\%$. Los resultados de la integridad mitocondrial mostraron diferencias estadística significativas ($P \leq 0.05$) entre el control (83.74 ± 1.01) y las fracciones obtenidas, siendo la más baja F2 ($40.74 \pm 1.04\%$). Al realizar el sexado por citometría de flujo se obtuvo un enriquecimiento del 84% para los espermatozoides portadores del cromosoma Y, así como un 90% X, mostrando una integridad acrosomal de 46.91 ± 1.12 y una integridad mitocondrial de 46.23 ± 8.84 . En conclusión todos los tratamientos influyeron significativamente sobre la integridad acrosomal y mitocondrial, siendo mejor la separación de las poblaciones espermáticas por método de citometría, sin embargo el que mejor mantuvo la viabilidad de las células fue el gradiente por densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio.

I.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas reproductivas que incluyen la inseminación artificial, la transferencia de embriones y el sexado de semen (Ordoñez, 2005), todo esto con el fin de optimizar la producción animal a través del mejoramiento genético. Los primeros intentos para poder determinar el sexo de la progenie previo a la concepción vienen desde los filósofos griegos, los cuales creían que comer carne roja o sangre de león podrían tener un efecto final en el sexo de la cría; todo esto basado en creencias populares, supersticiones o en la mitología (Campus *et al.*, 1995).

Y no fue hasta en el siglo XX con el descubrimiento de los cromosomas sexuales y su papel en la determinación sexual que se obtuvo la primera evidencia científica (Guyer, 1910). En la actualidad el deseo por seleccionar el sexo de la progenie sigue vigente, ya que desde un punto de vista zootécnico es una herramienta de gran utilidad para aumentar la eficiencia reproductiva, trayendo consigo beneficios económicos, principalmente en especies domésticas (Vazquez, 2008).

Cuando se habla de animales de fauna silvestre la mayoría de los planes de manejo en cautiverio se enfocan solo en aspectos genéticos y en cuestiones relacionadas a la cría, sin darle tanta importancia a los sistemas de organización social especie-específicos. En el caso de los delfines la estructura social está basada en la edad y la proporción de los sexos, ambos aspectos son necesarios para mantener un comportamiento social normal. Sin embargo en numerosos entornos en cautividad la habilidad para mantener esta cohesión social es un

problema, por lo que el poder seleccionar el sexo de la progenie se ha convertido en una de las principales metas en los programas reproductivos (O'Brien y Robeck, 2006).

En este estudio, se obtuvieron muestras de semen de delfín nariz de botella las cuales fueron sexadas por la técnica de centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio y validadas por citometría de flujo, también se realizó la separación de los espermatozoides X y Y empleando esta última técnica con la finalidad de comparar ambas metodologías y evaluar su efecto sobre la viabilidad de las células.

II.- GENERALIDADES

La información con la se cuenta actualmente acerca de la anatomía y fisiología reproductiva de los delfines es muy poca. Anteriormente la mayor parte de la información había sido obtenida mediante la recolección de los órganos de estos animales en estaciones balleneras, barcos o museos. Fue hasta el año de 1938 con la apertura del primer delfinario en Florida, que se logró mantener con éxito algunos ejemplares de delfines en cautiverio, iniciándose así el estudio sistemático de la anatomía y fisiología de estos animales (Wood, 1977). El delfín nariz de botella es la especie comúnmente mantenida en cautiverio, ya que presenta una buena respuesta al entrenamiento y una mayor habilidad para tolerar el cautiverio (Mayer, 1998).

A mediados de los 70's la industria de espectáculos en México inicia con la inclusión de mamíferos acuáticos y desde entonces el número de empresas dedicadas al entretenimiento ha ido en aumento, al igual que los animales mantenidos en cautiverio (Mayer, 1998).

En el año 2003 se decretó la Norma Oficial Mexicana 135 de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (NOM-135-SEMARNAT) para la regulación de la captura para la investigación, transporte, exhibición, manejo y manutención de mamíferos marinos en cautiverio y la Ley General de Vida Silvestre en la cual se prohíbe la importación y/o captura de delfines, con lo que se obliga a los delfinarios a reproducir a sus animales y así obtener reemplazos.

Debido a la imposibilidad de adquirir delfines de vida libre y/o de otros países y a la importancia en la conservación de fauna silvestre es necesario implementar diversas tecnologías reproductivas, entre ellas las que permiten aumentar el reservorio del material genético de los mamíferos marinos bajo el cuidado humano, para con esto mantener una mayor diversidad genética.

2.1 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

Los machos presentan dos testículos en forma cilíndrica, cada uno de estos localizados lateral y caudalmente a los riñones, se encuentran fijos a la pared dorsal de la cavidad abdominal. La túnica vaginal que cubre a los testículos, y también gran parte del epidídimo, tiene un color blanco grisáceo. La túnica albugínea es una membrana gruesa y resistente, que se fusiona con la túnica vaginal (Green R.F, 1977).

El testículo está formado por lóbulos de forma irregular, cada uno dividido por membranas septales; numerosos y pequeños canales en el septum forman la *rete testis* y se unen para formar el conducto eferente corto y aplanado que llega al epidídimo. Este último es extensamente sinuoso dividiéndose en cabeza, cuerpo y cola y distalmente presenta un incremento de tamaño formando así el conducto deferente, además existe un tubo ciego localizado en la parte distal del conducto deferente el cual se describe como un órgano reproductivo accesorio (glándula prostática) (Green, 1977).

El pene de los delfines es fibroelástico, tiene su origen en la superficie media de los vestigios de los huesos pélvicos, siendo similar al de los rumiantes. Es retráctil y con una flexura sigmoidea, está soportado por el cuerpo cavernoso y la túnica albugínea que se insertan en los huesos isquiáticos de la pelvis. No existe *os peneana*. De la región pélvica el pene corre anteriormente, proyectándose dentro del saco peneal. En el pene relajado la curvatura en forma de “S” es mantenida por los músculos retractores del pene, que se originan en la pared rectal anterior y se insertan en la porción ventral del pene inmediatamente atrás del cono terminal (Pabst *et al.*, 1999).

La piel que recubre el saco peneal se refleja hacia adelante para cubrir el primer tercio anterior del pene (cono terminal). Cuando el pene está erecto el recubrimiento del saco peneal es estirado hacia afuera para cubrir el tercio medio del pene, posterior al cono terminal. La erección del pene se debe parcialmente a la estructura fibroelástica del órgano, a la turgencia causada por la infiltración de sangre en el tejido cavernoso y a la relajación de los músculos retractores del pene. Fig. 1 (Green, 1977).



Fig. 1 Imagen de la erección del pene de un delfin nariz de botella (*Tursiops truncatus*) donde se observa una irrigación debido a la infiltración de sangre en el tejido cavernoso.(Dolphin Discovery, Six Flags, 2014).

2.2 MADUREZ SEXUAL

Diversas observaciones indican que los delfines machos tienen erecciones en un periodo cercano a las 48 horas posteriores a su nacimiento, esto debido a que los delfines poseen un control físico altamente desarrollado y las crías pueden intentar la cópula (normalmente con la madre) a las pocas semanas de nacidos. El joven macho continúa sus intentos por copular conforme se va desarrollando y puede alcanzar un patrón copulativo a los pocos meses de nacido, pero no alcanza la madurez sexual sino hasta los doce años (Schroeder, 2001).

En el caso de las hembras, alcanzan la madurez sexual alrededor de los 6 años y son poliéstricas estacionales. La época de apareamiento puede llegar a ser muy estresante para los machos adultos; los testículos, la próstata y los músculos asociados a los órganos reproductivos aumentan de tamaño en esta época.

Aunado al estrés para controlar el territorio, hay peleas por las hembras y el consumo de alimento desciende marcadamente (Robeck *et al.*, 2001).

Las principales hormonas involucradas en la reproducción son producidas en el testículo; cada testículo consiste de 2 regiones funcionales en las que se incluyen a las células intersticiales y a los túbulos seminíferos, estos últimos delineados con las células germinales y las células de Sertoli. Los testículos secretan andrógenos los cuales participan en la espermatogénesis. La testosterona es producida por las células de Leydig, que se encuentran en el tejido intersticial y entre los túbulos seminíferos. (Kirby, 2001).

En los machos aproximadamente 2/3 de la testosterona circulante es producida por los testículos el resto es de origen adrenal. (Kirby, 2001).

La pubertad en los machos se caracteriza por un marcado incremento en el desarrollo testicular, del tamaño del pene y aumento circulante en los niveles de testosterona, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). (Kirby, 2001).

La madurez sexual de un macho se puede medir de diferentes formas: *postmortem* se puede basar en el peso testicular, en el diámetro de los túbulos seminíferos, la presencia de espermatozoides en éstos, y por la presencia de líquido seminal en el epidídimo (Seargent *et al.*, 1973; Perrin y Reilly, 1984; Cockcroft y Ross, 1990). *In vivo* se puede basar en la medición de las concentraciones de testosterona en plasma o mediante la edad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Madurez Sexual del delfín nariz de botella.

PATRÓN REPRODUCTIVO	EDAD	NIVEL DE TESTOSTERONA
Inmaduro	1 a 7 años	≤ 3 ng/ml
Púber	8 a 12 años	De 3 a 4.9 ng/ml
Maduro	> 12 años	De 5 a 54 ng/ml

(Adaptado de Kirby, CRC Handbook of Marine Mammals).

2. 3 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL

El entrenamiento animal ha existido desde hace mucho tiempo, desde la domesticación animal hasta la modificación de su comportamiento. B.F Skinner en 1983 publicó su libro “El Comportamiento de los Organismos” donde explica la psicología del aprendizaje y sus efectos en el comportamiento con fundamentos científicos basados en la etología y la psicología, cada una con un enfoque específico.

Mientras los etólogos se enfocan en la evolución del comportamiento haciendo énfasis en comportamientos instintivos, los psicólogos se basan en elementos del aprendizaje y de la influencia del ambiente sobre el desarrollo de un comportamiento (Galindo y Orihuela, 2004).

El condicionamiento es un proceso de modificación de la conducta, en donde un sujeto asocia un comportamiento deseado con un estímulo previamente no relacionado. Para comprenderlo, es necesario entender la relación entre comportamiento y estímulo.

Comportamiento es cualquier acto o respuesta medible u observable mientras que estímulo es lo que causa una respuesta conductual (comportamiento). (Pryor, 2004). Existen 2 tipos de Condicionamiento Animal:

2.3.1 Condicionamiento Clásico o Pavloviano

Tipo de aprendizaje basado en una respuesta fisiológica o involuntaria a un estímulo. Se llama pavloviano debido al experimento de Pavlov con la campana y el perro.

En presencia de su perro, Pavlov hacía sonar una campana (estímulo neutral) lo cual no provocaba respuesta en el comportamiento por parte del perro; pero si después de sonar la campana el perro siempre recibía su alimento, se establecía una relación entre la campana y el alimento. Al sonar la campana el perro comenzaba a salivar, aun cuando la comida no era presentada. Esta relación entre estímulo (el sonido de la campana y el alimento), causaba el comportamiento de salivación (respuesta fisiológica o involuntaria) por parte del perro (Pryor, 2004).

2.3.2 Condicionamiento Operante

Es un tipo de aprendizaje en donde la frecuencia de una conducta ocurre debido a la consecuencia que ésta tenga, es decir, donde el sujeto llega a asociar gusto o disgusto por la acción a causa de la consecuencia. En este condicionamiento la respuesta siempre será voluntaria. Un punto clave del condicionamiento operante es el refuerzo, el cual debe ocurrir al terminar el comportamiento y a causa de

este. El refuerzo no es más que un estímulo para que un comportamiento se repita en el futuro. (Pryor, 2004).

En el caso de los delfines, para la obtención de algún comportamiento se trabaja con 2 tipos de condicionamiento operante el emitido y el solicitado. El comportamiento emitido es algo que el animal hace naturalmente y el entrenador captura el momento en el que el animal lo presenta para así provocar la repetición del comportamiento. Un comportamiento solicitado es cuando el entrenador da cierta información para indicarle al animal que debe comportarse de cierta manera. (Dolphin Discovery: Training Techniques, 2006). Es importante utilizar una señal (marcaje) para indicarle al animal porque está siendo premiado o reforzado. A esta señal se le llama bridge (puente) el cual puede ser auditivo, visual o táctil. Esta señal le indica al animal un “sí” ese es el comportamiento que deseo y además le indica que el refuerzo está por llegar (Pryor, 2004).

2.3.3 Colección de Semen

1. Este comportamiento se debe realizar siempre en un encierro (holding) específico.
2. Palpar al animal en y alrededor del área genital, buscando tranquilidad y comodidad en él; no debe mover ni rostro ni aletas.
3. Con el ejemplar en decúbito dorsal, con la mano enguantada se introduce el dedo índice izquierdo en el área genital hasta tocar la punta del pene moviéndolo ligeramente de un lado a otro (aletas y cabeza del animal deben estar tranquilas y sin moverse).

4. La mano derecha debe estar debajo sosteniendo al delfín, entre ano y genitales. Con esto se está buscando pequeñas contracciones del músculo recto abdominal, oblicuo interno y del panniculus (que controlan la erección del pene).
5. En este paso es muy importante la mano derecha para sentir las contracciones, por más ligera que sea (como el pulso de la sangre) se debe bridgear (puente) y reforzar al animal.
6. Continuar estos pasos hasta sentir una contracción fuerte, el dedo índice se va alejando cada vez más del pene, para que funcione como un objetivo (target) y cada vez que el pene toque el dedo índice se bridgea (puente) y se refuerza al animal.
7. Así hasta lograr una exposición completa del pene, el cual debe lucir de un tono rosa rojizo (con una buena irrigación) y firme, antes de tocarlo.
8. Introducir una segunda persona quien sostendrá dorsalmente al animal a la altura del área genital y del ano.
9. Tocar el pene con un dedo luego dos y así sucesivamente hasta poder sujetarlo con toda la mano, sin incomodar al animal, ya que se logra este paso, iniciar movimientos ligeros de arriba hacia abajo para estimular.
10. Juntar dedo índice y pulgar formando un anillo, el cual permanecerá firme al momento de realizar el jalé (tirar del pene), utilizar toda la mano

para abrazar el pene, el anillo marca la altura del jalón. (este movimiento simula al realizado al poner el freno de mano en un automóvil).

11. Introducir la vagina colectora de semen y utilizar lubricante base agua.

El jalón debe ser rápido y firme; pero sin lastimar al animal simulando la intensidad con la que el macho penetra a la hembra (Dolphin Discovery: Training Techniques, 2006). (Schroeder, et al., 1983).

III.- ANTECEDENTES

En la actualidad el manejo reproductivo de especies de fauna silvestre se ha visto beneficiado por la integración y desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la reproducción asistida (Robeck y O'Brien 2004). En donde el sexado y la criopreservación de espermatozoides, en combinación con la inseminación artificial, ha tenido un gran impacto en la reproducción animal a nivel mundial, ya que ha permitido no solo incrementar el número de crías, sino el mejoramiento genético (Watson, 1995). Dado que los espermatozoides son células accesibles, tienen gran potencial para el establecimiento de un banco de germoplasma y son de gran interés, para lograr una separación de las poblaciones portadoras del cromosoma X, así como de las poblaciones portadoras del cromosoma Y (Gilmore *et al.*, 1998).

En el caso del semen del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) el primer informe de semen sexado fue realizado por O'Brien y Robeck (2006) utilizando citometría de flujo donde reportan un porcentaje de pureza del 91% tanto para espermatozoides portadores del cromosoma X como el Y.

3.1 DETERMINACIÓN SEXUAL EN MAMÍFEROS

La determinación sexual ocurre en el momento de la fertilización (Díaz y Merchant, 2008). El cromosoma Y fue identificado en 1959 como un factor determinante del sexo en ratones y humanos (Sekido y Lovell, 2008). En la actualidad esta información se complementa con un sistema heterocigótico XY para los machos y homocigótico para las hembras XX.

Durante la vida fetal se establece el sexo gonadal, a partir de la cresta gonadal indiferenciada que en las hembras se diferenciará como ovario y en los machos como testículo (Hernández, 2008).

El desarrollo testicular se induce por el gen SRY, que funciona como un “switch” induciendo a otros genes a desencadenar la diferenciación de las crestas gonadales a testículos; el gen se encuentra localizado en el cromosoma Y y es considerado el factor determinante de testículo (FDT). (Schmal *et al.*, 2000),

El gen SRY está relacionado celularmente con la proliferación de las células presentes en las crestas genitales (Schmal *et al.*, 2000); específicamente con la diferenciación de las células de Sertoli (Burgoyne *et al.*, 1988) y con la migración de células del mesonefros a las crestas genitales (Buehr *et al.*, 1993).

Aunque hay reportes que indican que este gen solo participa indirectamente, en el caso de los ratones, la migración y proliferación de células de Sertoli ocurre a los 11.5 días post-coito, observándose que en esta etapa el pico de expresión del gen ha finalizado; proponiéndose la existencia y activación posterior de otros genes como el Sox9, el cual se ha observado que promueve y mantiene la diferenciación del testículo en hembras transgénicas (Kidokoro *et al.*, 2005).

La última etapa es la diferenciación sexual somática, que corresponde a la diferenciación de los conductos de Wolff y del seno urogenital, los cuales son precursores de los genitales internos y externos respectivamente (Díaz y Merchant, 2008).

3.2 ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide o gameto masculino, es una célula altamente especializada en el almacenamiento y transporte de material genético, por lo que tiene una limitada capacidad de auto reparación (Aurich, 2005). En el espermatozoide de delfín, al igual que en el de los demás mamíferos, se pueden identificar diversos segmentos: una cabeza, la cual es elipsoide, un cuello que une a la cabeza con el flagelo; este último se divide en la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal, todas estas estructuras delimitadas por la membrana plasmática. La longitud de la cabeza es de 4.5 μm y 2 μm de ancho; la longitud de la pieza media es de 4 μm ; la longitud del flagelo es de 60 μm (incluyendo la pieza media), teniendo un tamaño total promedio de 65 μm (Fleming, 1981).

En la cabeza se encuentra el núcleo el cual contiene cromatina altamente condensada con un contenido de DNA haploide.

Rodeando al núcleo esta la teca perinuclear y el acrosoma que ocupa la región anterior de la cabeza (Juárez, 2000). El acrosoma es originado durante la fase de espermatida a partir del complejo de Golgi; éste contiene las enzimas necesarias para la penetración del ovocito tales como son la hialuronidasa y la acrosina. El

acrosoma consta de una membrana interna localizada por arriba de la teca perinuclear y una membrana externa relacionada con la parte de la membrana plasmática de la cabeza espermática. El cuello abarca desde la cabeza en la base del núcleo hasta la pieza media del flagelo, aquí se pueden observar diferentes estructuras como la placa basal, los cuerpos laminares, el *capitulum*, las columnas segmentadas, el cuerpo basal y el axonema (Mackinnon y Voss, 1993).

La pieza media se extiende desde la región distal del cuello hasta el anillo de Jensen (*annulus*); en esta parte podemos distinguir el axonema, la vaina mitocondrial y las fibras densas (Fawcett, 1975).

El axonema ocupa todo el eje central del flagelo y se forma por 2 microtúbulos simples, que a su vez está rodeado por nueve dobletes de microtúbulos y diversas proteínas (Fawcett, 1975).

3.2.1 Diferencia entre espermatozoides X y Y

Desde que se determinó que el gameto masculino es el que determina el sexo, se han estudiado las diferencias entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y Y (Seidel, 2003). Se han reportado varias diferencias:

3.2.1.1 Cuerpo F

En el espermatozoide de humano el brazo largo del cromosoma Y emite mayor fluorescencia utilizando un fluorocromo llamado quinacrina (Barlow y Vossa, 1970), observándose como un punto fluorescente en la cabeza del

espermatozoide con cromosoma Y, al cual se le denomino cuerpo F o Y (Beernik *et al.*, 1993).

3.2.1.2 Proteínas de Superficie

En la superficie de la membrana celular se encuentra una proteína llamada antígeno de histocompatibilidad Y (antígeno H-Y), el cual está ausente en las hembras; es decir se ha propuesto la existencia de una proteína específica del sexo (*sex specific protein* SSPs) señalando que la existencia del gen que codifica para esta se encuentra localizado en el cromosoma Y (Peter *et al.*, 1993, Johnson *et al.*, 2005).

3.2.1.3 Motilidad

Debido a que el espermatozoide Y tiene menor tamaño, se ha reportado que tiene mayor rapidez en su motilidad (Ericcson, 1999).

3.2.1.4 Tamaño y forma

Los espermatozoides de los mamíferos difieren en la forma de la cabeza, la mayoría presenta una forma ovalada, exceptuando a los roedores que presenta forma de coma (Garner, 2006).

En los espermatozoides bovinos con cromosoma X tienen un 1% de tamaño mayor que los espermatozoides que contienen el cromosoma Y (Van Muster *et al.*, 1999), (Seidel, 2003); esto difiere de lo mencionado por Campus *et al.*, (1995) el cual indica que el espermatozoide con cromosoma X es más grande que el Y en

un porcentaje alrededor de 2.9 y 4.2%. En el caso de los humanos se ha reportado que la cabeza es más larga y ancha en espermatozoides con cromosoma X (Cui y Mathews, 1993). Van Muster *et al.*, (1999) determinaron que el volumen de la cabeza es en un 4% mayor en los espermatozoides con cromosoma X, que en los espermatozoides con cromosoma Y, lo que hace pensar que estos sedimentaran más rápido que los espermatozoides Y al ser sometidos a un campo centrifugo. En el caso del delfín nariz de botella no hay reportes sobre alguna diferencia entre ambos tipos de espermatozoide.

3.2.1.5 Contenido DNA

La medición del contenido de DNA se realizó por primera vez por Garner (2006), quien utilizó la citometría de flujo observando una pequeña pero mayor diferencia en los espermatozoides portadores del cromosoma X, esta diferencia en la cantidad de DNA varía entre especies y en algunas ocasiones entre razas. (Parrilla *et al.*, 2005, Garner, 2006) Fig. 2.

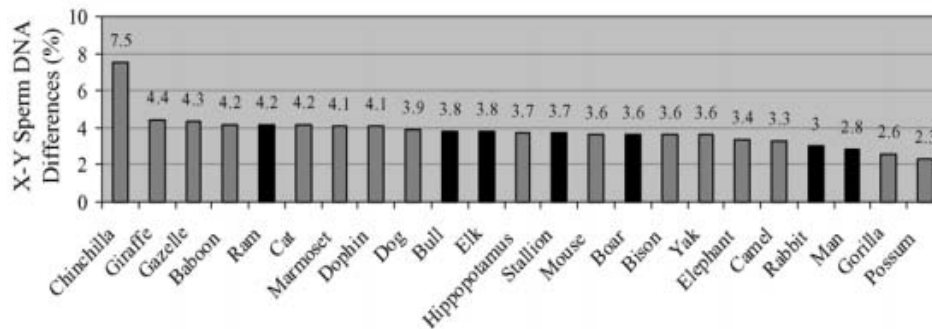


Fig 2. Diferencias en el contenido de DNA entre el espermatozoide con cromosoma X y Y, de diferentes especies animales. Observando un 4.1% para el delfin. Garner,2006).

3.3 MÉTODOS DE SEXADO

Los métodos de sexado se basan en las diferencias que existen entre los espermatozoides portadores de cromosoma X y Y para separar ambos tipos de poblaciones lo cual permite: modificar la proporción natural entre individuos; al seleccionarse el sexo de la descendencia previo a la concepción (Parrilla *et al.*, 2005).

Cualquier método de separación debe cumplir 3 premisas fundamentales: (Jafar y Flint, 1996)

- 1) Producir una desviación evidente de la población X o Y.
- 2) No interferir con la capacidad fecundante ya sea *in vitro* o *in vivo* de los espermatozoides.
- 3) Dar embriones o camadas vivas que confirmen la eficacia del protocolo ya sea hacia espermatozoides X ó Y.

3.3.1 Citometría de Flujo

En la actualidad es la técnica más eficiente para la separación espermática (Johnson, 1999), utilizándose en un gran número de especies (Garner, 2006), incluyendo el delfín nariz de botella. Esta técnica está basada en la diferencia del contenido de DNA, de los espermatozoides que portan el cromosoma X y los que portan el cromosoma Y, que en el caso del delfín nariz de botella es de 4.1% (Garner, 2006).

Para lograr la separación, las células son “teñidas” con un fluorocromo (Hoechst 33342), el cual se une al DNA y son pasadas a través de un flujo bilaminar donde son expuestas a un rayo ultravioleta (UV). Las células que emiten mayor fluorescencia tienen mayor cantidad de DNA; esta fluorescencia es captada por un tubo fotomultiplicador que mediante un sistema computarizado convierte la intensidad de fluorescencia en información que puede ser cuantificada, separando a las células de acuerdo a la intensidad de fluorescencia emitida. (Seidel *et al.*, 2003, Rosenfeld *et al.*, 2004) Fig.3.

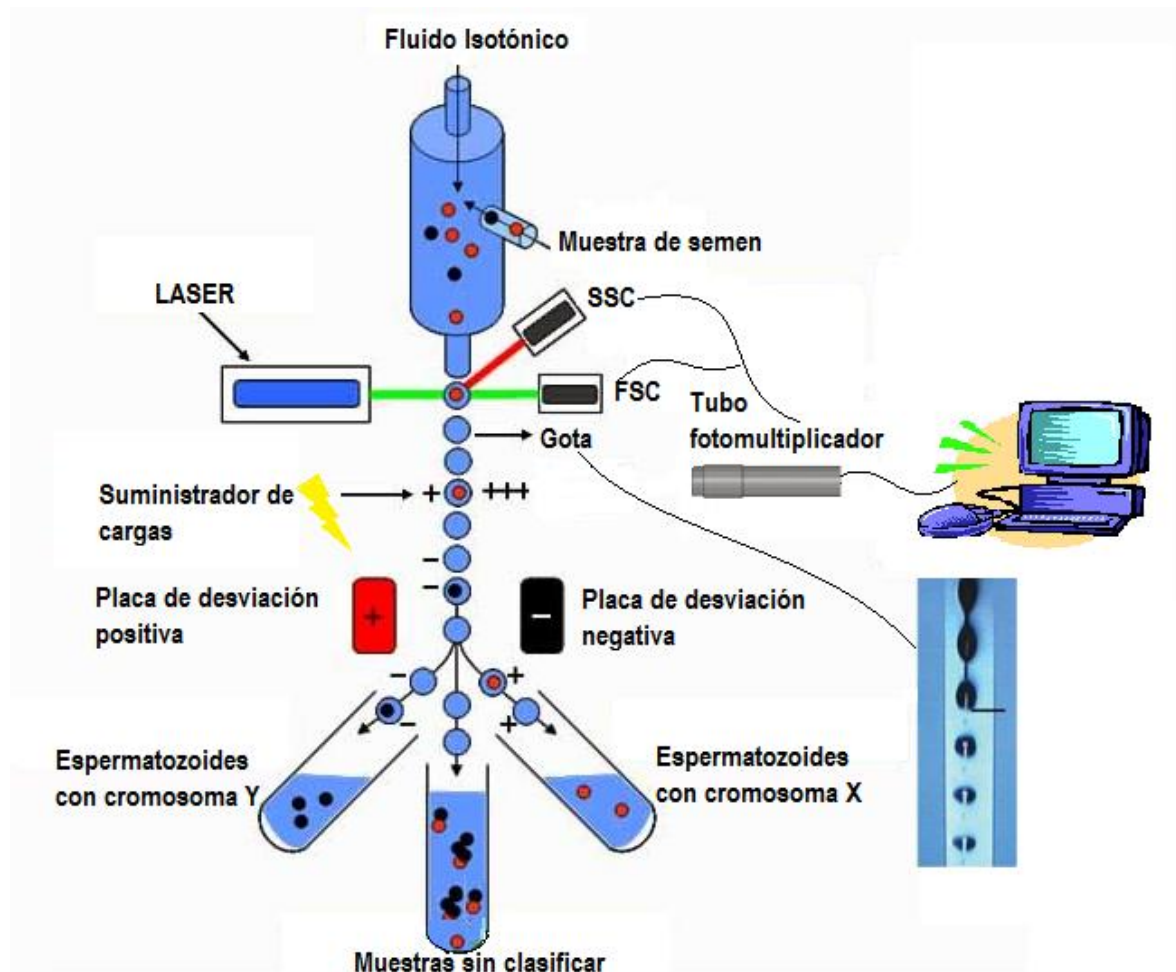


Fig. 3 Esquema de los componentes y el proceso de clasificación espermática mediante un citómetro de flujo (Adaptado de Noe, 2013)

Uno de los problemas con la citometría de flujo es que después de todo el proceso las células espermáticas presentan una disminución considerable en la viabilidad; lo cual se ha asociado a fragmentación del DNA (Seidel, 2002), capacitación prematura, daño acrosomal, disminución de la motilidad y por lo tanto de los parámetros de fertilidad (Hollinshead, 2003). Aunado a que hay una velocidad de separación lenta, aproximadamente entre 3,000-4,000 células por minuto, pero la eficiencia de separación es del 90%, esta velocidad de separación se puede incrementar pero la eficiencia del proceso disminuye hasta un 80% (Seidel *et al.*, 2003, Valencia *et al.*, 2001). Además de necesitar personal altamente capacitado para realizar el sexado, lo que eleva el costo de las células sexadas (Wilson *et al.*, 2006).

Si bien se ha reportado el nacimiento de camadas pequeñas en cerdos y conejos, empleando esta técnica, así como un retraso en el desarrollo embrionario y alta mortalidad en embriones (Graf *et al.*, 2009).

Las principales causas por las que hay una disminución de la fertilidad es debido al estrés físico-químico al cual se someten las células durante todo el proceso tales como son:

- El fluorocromo Hoechst 33342 que queda intercalado en el DNA (Seidel y Garner, 2002).
- Diluciones durante la tinción (Catt *et al.*, 1997).
- Velocidad, presión y campo electromagnético durante la utilización del citómetro (Maxwell y Johnson, 1999).

- Exposición al laser (Catt *et al.*, 1997, Schenk *et al.*, 1999, Guthrie *et al.*, 2002).
- Fuerza mecánica durante el sexado (Suh y Schenk, 2003).

Lo anterior ha sido involucrado en la disminución de la viabilidad espermática, la cual se ha relacionado con la capacitación espermática o la reacción acrosomal inducida por daños a la membrana a causa del proceso de separación (Hollinshead *et al.*, 2003, Maxwell *et al.*, 1997). Todas estas modificaciones en la célula espermática afectan su interacción con las células del oviducto y por consiguiente disminuyen los porcentajes de fertilidad (Hollinshead *et al.*, 2003).

Hasta el día de hoy se han intentado disminuir los efectos ocasionados por el proceso utilizando diversas soluciones amortiguadoras, pigmentos comerciales para alimentos o plasma seminal (Shenk, 1999; Hollinshead, 2004; De Gaaf, 2008). A pesar de esto aun no se ha encontrado un protocolo eficaz que evite o disminuya el daño ocasionado por esta técnica.

3.3.1.1 Fluorocromos

Un fluorocromo o fluoróforo, es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula el que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda, es decir, con menor energía. La cantidad

de energía emitida y su longitud de onda dependen tanto del propio fluorocromo como de su ambiente químico (SEDAI Universidad Lleida, 2010).

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células. Las propiedades ideales de un fluorocromo son:

- a) Alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz).
- b) Alto rendimiento cuántico (emisión de luz)
- c) Elevada fotoestabilidad.
- d) Corto estado de excitación.

Si el fluorocromo va a estar unido a algo, éste debe ser insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente (SEDAI Universidad Lleida, 2010).

Hay fluorocromos con diferentes tipos de unión:

- Covalente: Son fluorocromos que reaccionan y se usan para marcar proteínas, lípidos, o bien otras moléculas biológicas. Deben ser suficientemente selectivos y reactivos. Se emplean cromóforos con grupos isotiocianato, clorotrizinil, y ésteres de succinimida, por su capacidad de unión. Los más empleados son la fluoresceína y la ficoeritrina este último por su gran absorción, rendimiento y fotoestabilidad. Aunque también se han descrito y empleado rodamina, rojo texas, cianinas etc.

- Unidos no covalentemente a estructuras celulares: Son los que debido a su composición molecular se unen a determinados componentes celulares. Tales como marcadores del contenido en DNA, RNA o determinadas bases. Se emplean el Hoechst 33342 (Unión a A-T, vital), DAPI (A-T), DIPI (A-T), cromomicina A3 (Unión a G-C), olivomicina (G-C), mitramicina (G-C). El naranja de acridina se une al ADN y ARN pero tiene la particularidad de emitir en diferente longitud según al tipo de ácido nucleico al que está unido. De uso común es el yoduro de propidio (unión intercalante). Marcadores del potencial de membrana como las cianinas y la rodamina 123. También para marcar mitocondrias, membranas y lípidos, marcadores que diferencian compartimentos con distinto pH, los cuales son poco utilizados en citometría de flujo.
- Sensibles al microambiente: ciertos fluorocromos pueden ser empleados para estimar las propiedades del ambiente en el que se encuentran, puesto que varían su espectro de absorción o emisión en función de las características del microambiente que les rodea. Se emplean para la determinación de diversos estados funcionales celulares: pH, calcio, potencial red-ox, actividad enzimática, polaridad y viscosidad/fluidez (SEDAI Universidad Lleida, 2010).

3.3.1.1.1 Hoechst 33342

Es un colorante sintético fluorescente disbenzimidazol, que contiene 2 anillos consecutivos con grupo terminal N-metil piperazina y grupos fenólicos. Puede

atravesar la membrana de las células, uniéndose a las bases adenina-timina en la cadena de DNA. Es soluble en agua y es considerado poco tóxico, se excita con luz UV (Haugland, 2001). Algunos tipos celulares son más sensibles al fluorocromo por lo que pueden verse afectadas por la concentración, en humanos para la separación espermática se utiliza una concentración de 112mM (Watkins *et al.*, 1996, Spinaci *et al.*, 2005).

El Hoechst 33342 es el fluorocromo de elección para medir la cantidad de DNA en los cromosomas X y Y, y separar las poblaciones espermáticas, aparentemente no causa problemas detectables fenotípicamente (Seidel, 2007) y puede separar poblaciones hasta con diferencias $\leq 3\%$ en el contenido de DNA (Garner, 2009). Aunque es cierto que esta tinción decrece la viabilidad espermática, como la célula espermática mantiene sus características morfológicas y funcionales puede ser utilizado satisfactoriamente o almacenado (Spinaci *et al.*, 2005).

3.3.2 Centrifugación

Otra alternativa para el sexado de semen es la centrifugación en gradientes de densidad, que se basa en la aplicación de una fuerza centrífuga que separa partículas en un medio líquido (Rickwood, 1984), la cual es empleada desde hace varios años para separar espermatozoides (Ericksson, 1973). El porcentaje de sedimentación depende de dos factores, la naturaleza de la partícula (tamaño), así como también del medio en donde estas se encuentran suspendidas (viscosidad) (Rickwood, 1989), a mayor tamaño, la partícula sedimentará con mayor rapidez.

Existen diferentes tipos de centrifugación:

- a) Centrifugación diferencial o empastillado: Donde la muestra se pone en un tubo y por medio de centrifugación se obtienen 2 fracciones, una pastilla (sedimento) y el sobrenadante (fracción no sedimentada).

- b) Centrifugación zonal: La cual tiene el propósito primario de facilitar la distribución de la muestra a través de un tubo al estratificar el gradiente generando que las partículas se establezcan en una zona de mayor a menor densidad sobre el tubo (Rickwood, 1989, Montero, 2010).

- c) Centrifugación isopícnica: la base de esta es la separación en base a densidad, donde solo el tamaño de la partícula afecta su coeficiente de sedimentación. Las partículas se mueven hasta que su densidad es igual a la del medio (Rickwood, 1989).

- d) Centrifugación en gradientes de densidad: Movimiento de partículas suspendidas en un medio fluido de acuerdo al peso de las mismas, a las cuales se les aplica una fuerza centrífuga, en donde las partículas más pesadas llegan al fondo más rápido que las menos pesadas (Hassan *et al.*, 2005).

El medio para formar un gradiente de densidad es en base a un soluto y un disolvente, estos gradientes pueden ser continuos o discontinuos, presentar capas con diversas densidades, en donde la densidad mayor estará en el fondo del tubo (Vázquez, 2008)

Los gradientes deben cumplir ciertas características como: (Rickwood, 1989)

- ✓ Amplio intervalo de densidad.
- ✓ No afectar la actividad biológica de la muestra.
- ✓ No ser hipo o hiperosmóticos.
- ✓ De fácil remoción.
- ✓ Económico, accesible y esterilizable.
- ✓ No ser tóxico, corrosivo o inflamable.

La separación en gradientes de densidad está en relación con el peso de las partículas (Hassan *et al.*, 2005): así la diferencia entre el contenido de DNA de espermatozoides con cromosoma X y Y provoca una diferencia de peso y por lo tanto en la densidad de estos, permitiendo su separación por medio de un gradiente continuo o discontinuo (Machado *et al.*, 2009) y aparentemente sin daño sobre la célula lo que mantiene su capacidad fecundante (Flaterty *et al.*, 1997). En el caso de los bovinos se estimó que la diferencia en el contenido de DNA entre X y Y resulta en una diferencia en la densidad de un 0.06%, lo que técnicamente es suficiente para separarlos físicamente (Windsor *et al.*, 1993), aunque también se ha demostrado que se requieren técnicas con un elevado nivel de resolución para lograr esta separación.

Por esta situación la técnica ha generado mucha controversia desde sus primeros reportes. Ericsson *et al.*, (1973) reportaron un 85% de enriquecimiento de la

población Y del espermatozoide de humano, mediante un gradiente de albumina sérica bovina, contrariamente con esta misma técnica se aisló el mismo porcentaje de espermatozoides con cromosoma X (Flaterty *et al.*, 1997).

Parati *et al.*, (2006) utilizando una combinación de Ficoll-Metrizoato de Sodio reportaron el enriquecimiento de hasta 76% de espermatozoides con cromosoma Y, y un 80.6% para X. Hedge (1977) utilizando un gradiente formado con 8% de Ficoll y 33% de metrizoato de sodio con una densidad final de 1.08g/ml reportó la separación de espermatozoides humanos centrifugados a 100 g durante 20 minutos, validando la técnica con quinacrina para evidenciar el cuerpo F (Parati *et al.*, 2006). En semen bovino utilizando un gradiente a base de Percoll con una densidad de 1.004g/ml se observó un enriquecimiento del 75% para la población portadora del cromosoma X (Hossepián, 2003).

Vázquez (2008), al utilizar Ficoll-Diatrizoato de sodio con una densidad de 1.086 g/ml, reportó el enriquecimiento del 90% para la población X en espermatozoides de bovino. López (2010) al repetir esta técnica con espermatozoides de ovino reporta que no obtuvo enriquecimiento alguno al mostrar nacimientos con 50% de hembras y 50% machos; Rojas en el 2011, con una modificación en el tiempo de centrifugación a la técnica mencionada por López obtiene al nacimiento 60% de hembras, observándose que si hay enriquecimiento pero se requiere estandarización de la metodología.

3.3.2.1 Ficoll

Es un polisacárido sintético altamente ramificado con alto peso molecular 400kDa formado por la co-polimerización de sacarosa y epíclorhidrina. Es completamente no iónico debido a la abundancia de grupos hidroxilo, por lo que es muy hidrófilo y extremadamente soluble en agua (Sambrook, 1989).

La aplicación más común es como un medio para gradiente de densidad para la separación y el aislamiento de células eucariotas, orgánulos y células bacterianas. Densidad máxima de alcance hasta 1,2 g / ml (Sambrook, 1989).

3.3.2.2 Diatrizoato de Sodio

El diatrizoato de sodio es un reactivo comúnmente utilizado en los gradientes de densidad para la separación de células sanguíneas, también ha sido utilizado como un medio de contraste en radiología (Merck Index).

Diversos estudios han evaluado el efecto del diatrizoato de sodio sobre la viabilidad celular: se ha demostrado que causa una redistribución parcial de las proteínas de membrana en células MDCK (Schick y Haller, 1999).

3.3.2.3 Optiprep

Es una solución estéril comercial que contiene 60% de iodixanol en solución acuosa con una densidad de 1,32 g/ml. El iodixanol fue desarrollado como un medio de contraste para rayos X por lo tanto, ha sido sometido a rigurosas pruebas clínicas.

Es un compuesto no iónico, no es tóxico para células y es metabólicamente inerte. Se pueden hacer soluciones isoosmóticas en diferentes densidades útiles, tienen baja viscosidad y osmolalidad (Axis-Shield Protocols, Scotland).

3.4 MEMBRANA ACROSOMAL

El acrosoma es una estructura altamente conservada a lo largo de la evolución y es originado del complejo Golgi y en conjunto con el axonema es un sello distintivo del espermatozoide de muchos animales (Eddy, 1988).

Se forma durante el proceso de espermatogénesis a partir de la fusión de vesículas que provienen del aparato de Golgi, en las primeras fases de la espermiogénesis, se presenta en forma de vesícula acrosomal o proacrosomal tras la condensación del núcleo celular, la vesícula se dirige al extremo apical de la cabeza posicionándose ahí. El acrosoma está limitado por la membrana acrosomal externa (por debajo de la membrana celular) y por la membrana acrosomal interna (por encima de la membrana nuclear), contiene enzimas hidrolíticas necesarias para que el espermatozoide penetre el ovocito y así lograr la fertilización (Eddy, 1988).

En un espermatozoide vivo deben ocurrir cambios fisiológicos normales como la capacitación espermática la cual ocurre en el tracto reproductor de la hembra donde hay movilización de glicoproteínas, pérdida del factor estabilizador del acrosoma provocando el siguiente proceso conocido como reacción acrosomal, donde por, excitosis regulada, ocurre la liberación de diversas enzimas del acrosoma como la hialuronidasa y la acrosina, necesarias para penetrar la zona

pelúcida del ovocito (Flesch, 2000). Todo esto como un proceso altamente coordinado en respuesta a factores inductores naturales (Bedford, 1970). En contraste, si hay muerte celular hay pérdida del contenido acrosomal por el rompimiento de las membranas (Mendoza, 1992), por lo tanto, la integridad acrosomal es crucial para una fertilización normal (Sandro, 2011).

De esta manera, la evaluación del estado acrosomal ha sido usado como una prueba para valorar la viabilidad espermática (Suri, 2005).

Muchas metodologías han sido descritas para evaluar el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, como son la triple tinción (Gutiérrez, 1991), la tinción de amarillo naftol/ eritrosina B (Graham, 1987) y diversos métodos enzimáticos entre otros. En algunas especies a menudo es difícil monitorear el estado acrosomal con un microscopio convencional de luz, por lo que en la actualidad 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 (Martí, 2000).

3.4.1 Lectinas

Las lectinas reconocen y se unen a carbohidratos y azúcares conjugados, son muy utilizadas en la investigación para estudiar la distribución de carbohidratos de las glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares y cuando son marcadas con ciertos fluorocromos sirven para analizar la expresión, distribución y las alteraciones de los glicoconjugados de la membrana: los sitios de unión a

lectinas se restringen a ciertas regiones de los espermatozoides, como acrosoma y membrana plasmática (Yescas, 2006).

La PNA es una lectina que se obtiene del cacahuete (*Arachis hipogea*) la cual identifica residuos de β -galactosa (Montoya, 2008) uniéndose específicamente a la membrana acrosomal externa exponiendo algún daño en ésta (Graham, 2001). Este tipo de lectinas presentan menor cantidad de uniones específicas en otras áreas del espermatozoide (Dalimatas, 1997). La detección de fluorescencia completa en el espermatozoide indica un acrosoma intacto, si se observa el acrosoma con baja fluorescencia, parches o bandas en la región ecuatorial, se considera un espermatozoide con signos de daño o reacción acrosomal (Silva, 2006).

3.5 MITOCONDRIAS

Como el espermatozoide es una célula con un alto grado de especialización necesita generar la energía suficiente para mantener las vías anabólicas (Peña, 2009). Las mitocondrias se localizan helicoidalmente alrededor de las fibras densas en la pieza media del espermatozoide (Eddy, 1988) selladas herméticamente por puentes disulfuro (Otani, 1988).

Las mitocondrias son importantes para la evaluación de la calidad espermática, ya que tienen relación directa con la motilidad espermática, contienen su propio DNA y pueden ser fácilmente evaluadas (Carra, 2004), sin embargo hoy en día la relación que tienen las mitocondrias con su motilidad está bajo debate (Rodríguez, 2006). Es considerada un organelo fundamental para la fisiología del espermatozoide

(Del Olmo, 2013) debido a que existe una relación directa entre la motilidad espermática, la respiración mitocondrial y la fertilidad.

Participan en la producción de energía por medio de fosforilación oxidativa y glucolisis (Shi Ming, 2013), en la regulación del balance REDOX, en la regulación osmótica y en la homeostasis del Ca^{2+} (Peña, 2009).

Aquí están localizadas muchas enzimas y proteínas específicas del espermatozoide como la citocromo C oxidasa VIb, piruvato descarboxilasa E1 y creatinina cinasa (CK) (Yang, 2011), las cuales permiten a la célula modular la función mitocondrial durante la fertilización, además de contar con enzimas glicolíticas distribuidas en la cola del espermatozoide y cuyas modificaciones en el extremo N- terminal permite el anclaje en la vaina fibrosa (Bunch, 1998).

3.5.1 MitotrackerRed CMXRos®

Es un fluorocromo de color rojo que mediante difusión pasiva tiñe las mitocondrias de las células vivas, y su intensidad de fluorescencia depende del potencial de membrana. Presenta un rango de excitación y emisión de 579/599 nm (Life Technology Manual).

IV.-JUSTIFICACIÓN

A pesar de los esfuerzos mundiales de conservación no se puede garantizar la protección total de las especies, ya que existe captura clandestina e ilegal y en algunos países captura comercial de mamíferos marinos. A causa de esto la legislación existente en México Norma Oficial Mexicana 135 de la Secretaría de

Medio Ambiente y Recursos Naturales (NOM-135-SEMARNAT) regula la captura para la investigación, transporte, exhibición, manejo y mantenimiento de mamíferos marinos en cautiverio y la Ley General de Vida Silvestre prohíbe la importación y/o captura de delfines y por lo tanto imposibilitan el adquirir animales de vida libre o exportarlos de otros países.

Por ello, es necesario actuar de manera inmediata, integral y efectiva protegiendo a las especies marinas que por su alterada situación ecológica y/o poblacional resultan prioritarias debido, ya sea a que se encuentran en crítico peligro de extinción, que son factibles de recuperar y manejar a corto plazo, que producen un efecto de protección indirecta a otras especies y sus hábitat, que son carismáticas y por ende embajadores en las campañas de conservación, o bien, que poseen un alto grado de interés cultural o económico, como es el caso del los delfines. Para ello, entre otras cosas es necesario implementar diversas tecnologías reproductivas, así como aumentar el reservorio del material genético de los mamíferos marinos bajo cuidado humano, para mantener una mayor diversidad genética.

Hasta el momento, ya que se ha reportado el nacimiento de crías en diferentes especies utilizando semen sexado por citometría de flujo, y a pesar de que representa un elevado costo, se ha dejado de lado la búsqueda por encontrar otra metodología que permita ser eficiente, de bajo costo y que sea accesible para la obtención de crías de sexo conocido.

Por lo tanto, en este trabajo, se pretende aplicar la técnicas de centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio para obtener un mayor porcentaje de espermatozoides X así como la población de espermatozoides Y, utilizando semen de delfín, comparándola con la citometría de flujo y utilizando la citometría de flujo para validar la técnica de centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio.

V.- HIPÓTESIS

El sexado por la técnica de centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio permitirá separar las poblaciones X y Y del semen del delfín nariz de botella manteniendo una mayor viabilidad de las células en comparación con la técnica por citometría de flujo.

VI.- OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Valorar la viabilidad de los espermatozoides del delfín nariz de botella sexados mediante la técnica de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio y la técnica de citometría de flujo, así como la eficiencia de ambas técnicas.

6.2 Objetivos Específicos:

1. Evaluar diferentes medios de transporte para el semen de delfín nariz de botella.

2. Evaluar la viabilidad de los espermatozoides antes y después del sexado por centrifugación en gradientes de densidad.
3. Evaluar la viabilidad de los espermatozoides antes y después del sexado obtenidos por medio de citometría de flujo.
4. Comparar la eficiencia, así como la viabilidad de las células obtenidas por ambas técnicas.

VII.- MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras fueron obtenidas en las instalaciones de Dolphin Discovery México, en la locación Six Flags México, la cual está ubicada al sur la Ciudad de México, estas fueron procesadas en el Laboratorio de Morfología de FMVZ, UNAM y validadas en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) en el Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda, Siglo XXI, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

7.1 Sujeto de estudio

Se utilizó el semen de 1 animal (*Tursiops truncatus*) de 20 años de edad. El animal presenta buena condición corporal y físicamente sano. (Cuadro 2.)

Cuadro 2. Sujeto de estudio

Nombre	Especie	Locación	Jerarquía	Peso	Edad
Pegasso	<i>Tursiops truncatus</i>	Six Flags México	Macho α	172 Kg	20 años

7.2 Obtención y procesamiento de las muestras

Para la colección del semen el ejemplar fue trabajado durante una sola sesión por aproximación y exposición de pene voluntaria, previo entrenamiento mediante condicionamiento operante.

Se tomaron 20 eyaculados, 17 para separación mediante gradiente de densidad y 3 para citometría de flujo, el semen fue colectado una vez cada tercer día utilizando la técnica de mano enguantada y vagina artificial.

Los eyaculados obtenidos se evaluaron macroscópicamente tomando en cuenta el volumen y el color (cualquier cambio en la coloración es indicativo de semen de mala calidad, lo cual fue motivo de eliminación).

Posteriormente una pequeña muestra fue tomada para la evaluación en fresco tomando en cuenta la movilidad (movimiento en masa (MT) y el movimiento individual (MPr), además del cálculo de la concentración espermática del eyaculado.

7.3 Movilidad total

Para la evaluación de la movilidad total se colocó una gota de semen en un portaobjetos limpio, seco y a 37°C, y se observó en un microscopio de luz (Olympus Cx21) utilizando el objetivo 10X. La valoración final se basó en el vigor o potencia de las ondas espermáticas.

Valorándose en un rango de 0 a 5 (Cuadro 3). Los eyaculados que obtuvieron una calificación menor a 3 fueron desechados.

Cuadro 3. Valores para la evaluación de la movilidad espermática en masa.

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas y remolinos con movimientos muy rápidos.
4	Buena	Movimiento vigoroso, pero las ondas y remolinos no son rápidos.
3	Regular	Ondas con movimiento lento.
2	Pobre	No se aprecian ondas, pero si hay movimiento en la muestra.
1	Muy pobre	Movimiento muy ligero
0	Muertos	Sin movimiento

Adaptación de Salamon *et al* 1990.

7.4 Movilidad progresiva

Se utilizó una gota de semen diluida en una gota de solución salina fisiológica (SSF) sobre un portaobjetos, limpio, seco y a 37°C; se cubrió con un cubre objetos y se observó al microscopio de luz (Olympus Cx21) utilizando el objetivo 40X. Se observaron varios campos y se valoró subjetivamente el porcentaje de espermatozoides móviles en un rango de 0 a 100%; los eyaculados con un porcentaje menor al 70% fueron desechados. (Evans y Maxwell *et al.*, 1987).

Únicamente las muestras con adecuada movilidad (>70%) se utilizaron para la separación, basándonos en el criterio para congelación espermática (Salamon *et al.*, 1990).

7.5 Concentración del eyaculado

La concentración espermática se calculó mediante la dilución de 25µl de la muestra en 500µl de Tritón al 0.1% en solución salina (154mM). Se depositó una gota sobre un hematocitometro (cámara de Neubauer) y se evaluaron 5 cuadrantes de la cámara. El número de células se determina mediante la fórmula: $(FD \times \text{No. de células espermáticas} \times 10,000 \times 5)$. Donde FD es el factor de dilución (21); No. es el número de células contadas en los 5 cuadrantes de la cámara; 10, 000 dado por la dimensión de la cámara, y 5 el número de cuadrantes contabilizados.

7.6 Evaluación del Medio de transporte

Después de realizadas las valoraciones anteriores se dividió el eyaculado en 4 partes iguales para la evaluación de medios de transporte. Los medios evaluados fueron adicionados al eyaculado en una relación (1:1) y fueron los siguientes:

- a) PBS (buffer de fosfatos salino): 137mM NaCl , 2.7mM of KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄ (pH 7.4).
- b) MCM (medio mínimo de cultivo): 105.08mM NaCl, 1.71mM CaCl₂·2H₂O, 25.07mM NaHCO₃, 0.25mM C₃H₄O₃, 20mM C₃H₆O₃.
- c) VD (vellón dorado): 108.5mM Na₃C₆H₅O₇, 41.6mM C₆H₈O₇, estreptomina 100,000 µg, penicilina 100,000 UI.
- d) Semen sin diluir.

7.7 Sexado por Gradientes de densidad

Se ensayaron dos medios para la separación de las poblaciones espermáticas (X y Y). Uno de los medios se preparó empleando 8 gramos de Ficoll® PM 400 disuelto en 100 ml de PBS para obtener una solución al 8% y, de manera separada 16.4g de diatrizoato de sodio se disolvieron en 50ml de PBS para obtener una solución al 32.8%; una vez elaboradas ambas soluciones fueron mezcladas y se dejaron en agitación durante 16 horas a 4°C; posteriormente se almacenaron en tubos falcón de 15ml y se mantvieron a -20°C hasta su uso, la densidad final de la mezcla fue de 1.070g/ml (lo cual se ratificó mediante el uso de un picnómetro). Para la centrifugación del semen en este gradiente de densidad, el gradiente se descongeló a temperatura ambiente, de esta solución 1.5 ml fueron tomados y colocados en un tubo de ensayo, utilizando 8 tubos por ensayo. El otro medio fue Optiprep™ a una densidad de 1.070g/ml (preparado según las indicaciones del laboratorio), de este se tomaron 1.5ml y se colocaron en un tubo de ensayo, se utilizaron 8 tubos por ensayo.

Una vez formado el gradiente de densidad se colocaron 160×10^6 espermatozoides/ ml en la superficie del tubo, posteriormente la muestra fue centrifugada a 750 rpm x 15 min a 18°C. Transcurrido el tiempo se obtuvieron empleando una pipeta Pasteur las fracciones que se formaron por aspiración; así como la pastilla, y depositarlas en tubos de ensayo para lavarlas y eliminar el medio de separación, centrifugar a 2500 rpm x 5 minutos. Una vez lavadas las muestras fueron evaluadas por citometría de flujo para conocer el nivel de enriquecimiento de las poblaciones seleccionadas.

7.8 Evaluación del sexado por gradientes de densidad mediante Citometría de Flujo

A las muestras obtenidas por centrifugación y re suspendidas en PBS se les ajustó la concentración a 15×10^6 espermatozoides/ml. En un cuarto oscuro se adicionaron 25 μ l de Hoechst 33342 (224μ M) dejando incubar durante 60min a 35°C (Schenk, 1999). Para su transporte al citómetro, las muestras se colocaron en un termo a 35°C . Para el análisis por Citometría de flujo se utilizó un equipo BD FACS Aria® el cual cuenta con un láser Argón de 488 nm y un diodo violeta de 405nm, capaz de excitar al reactivo Hoechst 33342. Se seleccionan los eventos que correspondan a células, de acuerdo a los criterios de tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A) y que además resultaran positivos a la fluorescencia de 510 a 540nm (entre los fluorocromos más comunes que emiten a estas longitudes están Pacific Blue y AmCyan). Se capturarán 10,000 eventos que cumplan estos criterios (Fig. 4).

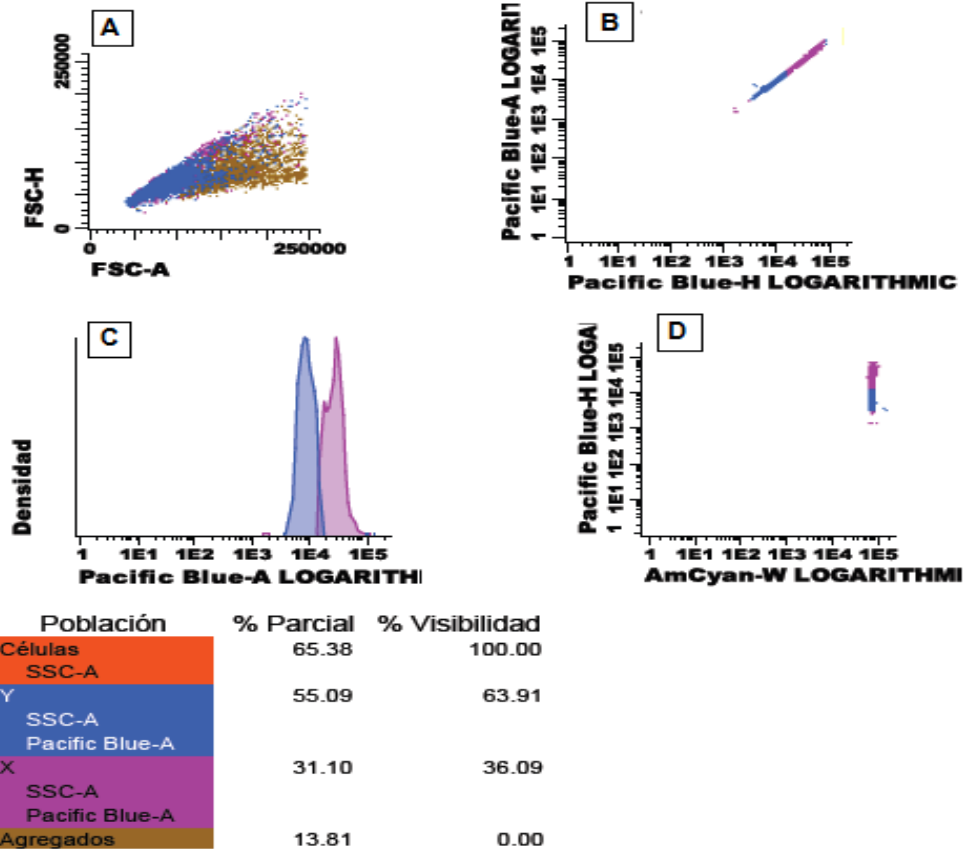


Fig. 4 Análisis por citometría de flujo de las poblaciones teñidas con Hoechst 33342 portadoras del cromosoma X y Y del semen del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) sometidas al gradiente de densidad con Ficoll- diatrizoato de sodio. A) Gráfica de puntos donde se observan las poblaciones espermáticas de acuerdo a su tamaño. B) Gráfica de puntos donde se observan las poblaciones espermáticas de acuerdo a la fluorescencia emitida (Pacific Blue). C) Histograma donde se observan las poblaciones espermáticas X (rosa) y Y (azul). D) Gráfica de puntos donde se observan las poblaciones espermáticas de acuerdo a la fluorescencia emitida (Pacific Blue y AmCyan)

7.9 Sexado por Citometria de Flujo

Las muestras espermáticas se llevaron a una concentración de 10×10^6 ml en medio MCM y teñidas con 25 μ L Hoechst 33342 (125 μ M) e incubadas a 35°C x 60 min (Hollinshead, 2003). Una vez preparada la muestra, se pasó por el sorter del citómetro de flujo BD FACS Aria® (láser Argón de 488 nm y otro de 305nm) para realizar la separación celular, este experimento se repitió 3 veces.

7.10 Evaluación de las muestras.

Para la evaluación, las muestras fueron ajustadas a una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml. Estas evaluaciones se realizaron antes y después del sexado.

7.10.1 Evaluación de la integridad de membrana

Esta evaluación se realizó mediante la tinción de eosina-nigrosina (Selles, Gadea Matas *et al* 2003). La muestra de semen fue diluida 1:2 (semen: colorante respectivamente) mezclando perfectamente. El semen fue incubado en este colorante durante 5 min a 37°C y se realizaron frotis que se dejaron secar al aire y ya secos se les aplicó resina para montar con cubreobjetos. Posteriormente se evaluó en un microscopio a un aumento de 100x contabilizando 200 células.

Interpretación: Las células con membrana plasmática alterada, se tiñen con el colorante, ya que este penetra al interior de la misma =Muerto

Las células con membrana intacta no permiten la penetración del colorante y por lo tanto no se tiñen =Vivo.

7.10.2 Evaluación de la membrana plasmática y del acrosoma.

Se realizó mediante la prueba FITC-PNA. Para la preparación de la solución stock, se usó el producto FITC-PNA (Invitrogen, México) a una concentración de 1 mg, para la cual fue re-suspendida en 1 ml de PBS (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se homogenizó y se tomaron 6 μl de la solución y se adicionó 99.4 μl de PBS para 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.

Las muestras llevadas a una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml. fueron incubadas con 20 µl de FITC-PNA por 30 min a 37°C en un cuarto oscuro. Pasado ese tiempo la muestra se lavó con PBS a 2500 rpm durante 5 min para retirar el exceso de fluorocromo. La pastilla se reconstituyó en 1ml de paraformaldehído al 2% en PBS durante 10 minutos; transcurrido ese tiempo se lavó nuevamente con PBS a 2500 rpm durante 5 min para retirar el fijador, se quitó el sobrenadante y reconstituyó en 200 µl de PBS (Jiménez, 2003). Se realizó un frotis con 25 µl sobre una laminilla colocándole una gota del medio de montaje glicerol:PBS (1:9), enseguida se coloca un cubreobjetos y se coloca barniz para uñas transparente para ser sellar.

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. Contabilizando 200 espermatozoides por laminilla.

Patrones (Fig. 5):

Intacto: se observa toda la región acrosomal teñida.

Irregular: se observan algunas porciones del acrosoma teñidas y otras no.

Región Ecuatorial: solo se tiñe la región ecuatorial del acrosoma, se observa una línea teñida en la mitad de la cabeza del espermatozoide.

Muerto: no se observa tinción.

Interpretación:

Acrosoma Integro: aquellos espermatozoides que presentaban patrones intacto e irregular.

Acrosoma dañado: espermatozoides con patrón ecuatorial o sin tinción.

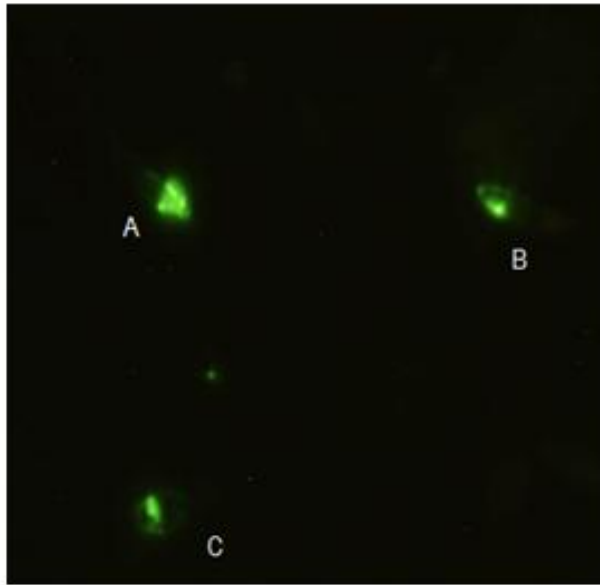


Fig. 5 Microscopia de fluorescencia espermatozoide de delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) teñido con la técnica de FITC-PNA. Donde se observaron los siguientes patrones a un aumento de 100 x. A) Espermatozoide con acrosoma íntegro B) Espermatozoide con acrosoma irregular C) Espermatozoide con región ecuatorial.

7.10.3 Evaluación de la Integridad Mitocondrial

Se realizó mediante el uso de MicrotrackerRed CMXRos® (conjugado de thiol-clorometyl). 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 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.

En un eppendorf se colocaron 35×10^6 de espermatozoides y se adicionaron 5 μ l Mitotracker Red CMXRos, las muestras se incubaron por 15 minutos a 35°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 2500rpm por 10 min para eliminar el exceso de colorante, la pastilla se reconstituyó en 1ml de paraformaldehído al 2% en PBS durante 10 minutos; transcurrido ese tiempo se lavó nuevamente con PBS a 2500 rpm durante 5 min para retirar el fijador, se quitó el sobrenadante y reconstituyó en 200 μ l de PBS (Flores, 2009). Se realizó un frotis con 25 μ l sobre una laminilla colocándole una gota del medio de montaje glicerol:PBS (1:9) , enseguida se colocó un cubreobjetos y se coloca barniz para uñas transparente para ser sellar. 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 diffactor™), utilizando el programa viewfinder 3.0. Contabilizando al menos 200 espermatozoides por laminilla.

Interpretación (Fig. 6):

Mitocondria integra: con fluorescencia roja homogénea.

Mitocondria defectuosa o dañada: se observan puntos o zonas sin fluorescencia.

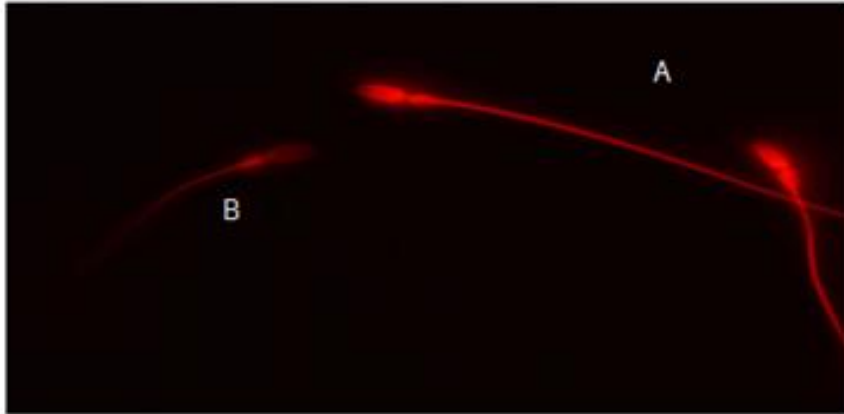


Fig. 6 Microscopía de fluorescencia de espermatozoides de delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) teñidos con la técnica de MitotrackerRed CMXRos®. Donde se muestran los patrones de tinción a un aumento de 100x. A) Espermatozoide con mitocondria integra. B) Espermatozoide con mitocondria dañada

VIII.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6 realizando un análisis de varianza en donde las muestras cumplieron los supuestos de homogeneidad de las pruebas, así como una prueba de T para comparar el efecto del tratamiento. En aquellas variables que por el tipo de comparación no se cumplen los supuestos de ANOVA se utilizó un análisis no paramétrico mediante la prueba Kruskal Wallis que es un equivalente de ANOVA. Los resultados se presentaron como medias (%)±S.E.M.

IX.- RESULTADOS

9.1 Evaluación de los medios de transporte

En promedio la motilidad total en los eyaculados recién obtenidos fue de $83.24 \pm 3.50\%$, así como una concentración de $656.9 \pm 389.3 \times 10^6/\text{ml}$

La viabilidad espermática en los eyaculados sometidos a diferentes medios de transporte (Semen solo, Vellón Dorado (VD), Medio mínimo de cultivo (MMC) y Buffer de fosfatos salino (PBS), se muestra en la Tabla 1, donde se puede observar una diferencia, aunque esta no es significativa ($P \geq 0.05$)

Tabla 1. Porcentaje promedio de espermatozoides del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) viables en los diferentes medios de transporte durante un periodo de 3 horas (Tinción de Eosina-Nigrosina).

MEDIOS	Viabilidad Promedio (%)
MMC	$71.39\% \pm 3.38^{ab}$
VD	$75\% \pm 3.08^b$
PBS	$72.71\% \pm 2.39^{ab}$
Solo	$61.79\% \pm 4.66^a$

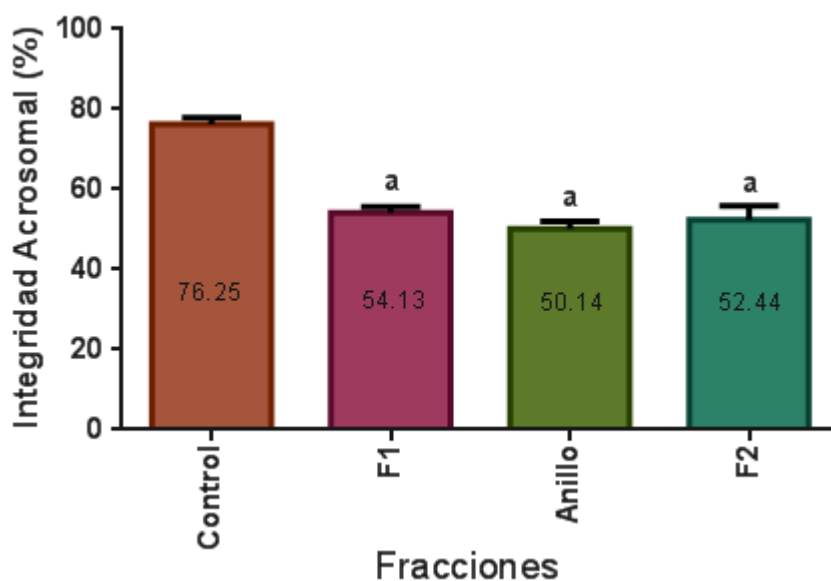
Medias \pm error estándar

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa $P \leq 0.05$

9.2 Evaluación de la Integridad de la membrana acrosomal

Se obtuvieron 3 fracciones en cada tubo: la fracción superior, que se encontraba en la superficie fue denominada F1, la intermedia Anillo y la fracción que se formó en el fondo del tubo se denominó F2. En la gráfica 1 se muestra el porcentaje de

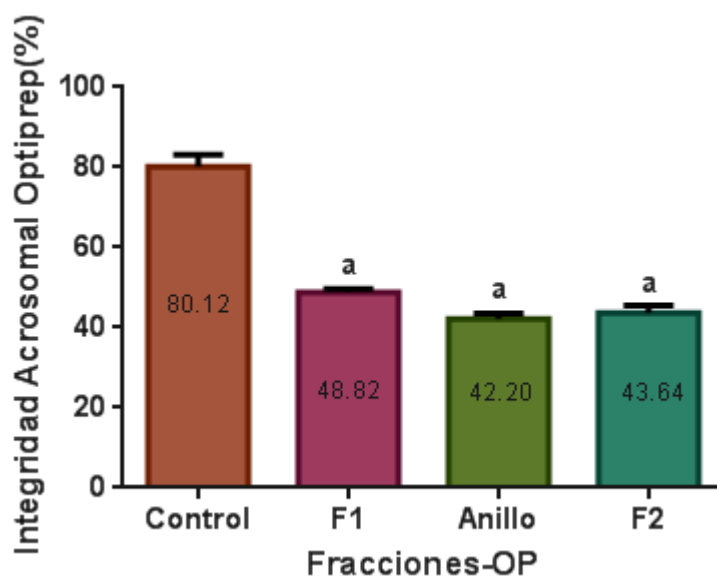
espermatozoides con acrosoma íntegro, evaluados mediante la prueba FICT-PNA. Las fracciones F1 y F2 presentaron mayor porcentaje de células integras 54.13 ± 1.50 y 52.44 ± 3.52 respectivamente en comparación con la fracción denominada (Anillo), la cual presentó una media de 50.14 ± 1.92 pero no se encontró diferencia estadística significativa entre las tres fracciones generadas, sin embargo se encontró una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre el control 76.25 ± 1.68 y cada una de las fracciones generadas por el gradiente. Es decir el tratamiento influyó significativamente sobre la integridad acrosomal.



Grafica 1. Porcentaje de Integridad acrosomal en el gradiente de Ficoll-diatrizoato de sodio evaluado mediante la tinción FITC-PNA. Datos expresados como media \pm S.E.M; n=17. Prueba de T. Literales diferentes indican diferencia estadística significativa entre las fracciones obtenidas y el grupo control (sin sexar) ($P \leq 0.0001$).

Adicionalmente, se evaluó un gradiente preparado con un medio comercial llamado Optiprep® donde los valores correspondientes a la integridad acrosomal, se muestran en la Grafica 2, en donde se puede observar valores menores a los

presentados en el gradiente de Ficoll-Diatrizoato de sodio; el control presentó una media de 80 ± 3.11 , siendo las fracciones Anillo y F2 estadísticamente significativas ($P\leq 0.05$) en comparación con el control, cuyas medias fueron de 42.20 ± 1.36 y 43.64 ± 1.92 respectivamente. La fracción F1 presentó una media de 48.82 ± 0.76 .



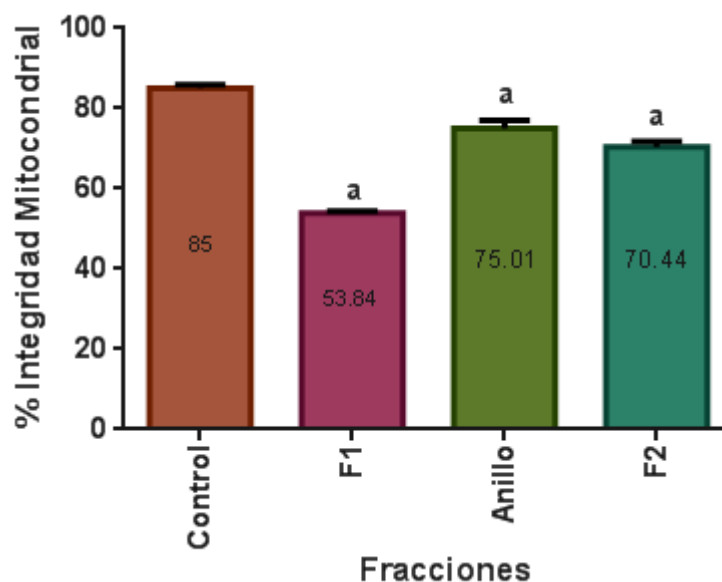
Grafica 2. Porcentaje de Integridad acrosomal evaluado mediante la tinción FITC-PNA en el gradiente Optiprep®. Datos expresados como media± S.E.M; n=5. Prueba de T. Literales diferentes indican diferencia estadística significativa con el grupo control ($P\leq 0.0001$).

9.3 Evaluación de la Integridad Mitocondrial.

En la Grafica 3 se presentan los resultados obtenidos al valorar la integridad mitocondrial.

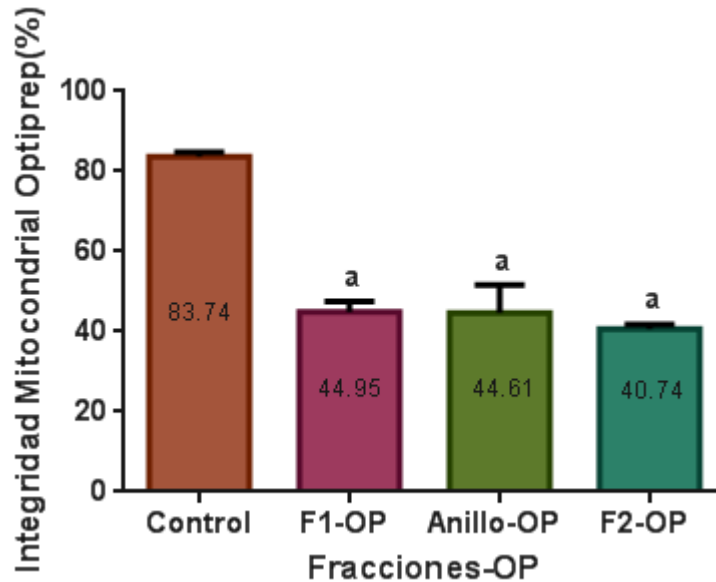
Donde se puede observar que el control presentó una media de 85 ± 0.84 habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre este con los valores encontrados para todas las fracciones generadas por el gradiente de Ficoll® PM 400-diatrizoato de sodio; siendo la diferencia menor para la fracción denominada

Anillo que presentó una media de 75.01 ± 2.06 , seguida por la fracción F2 con una media de 70.44 ± 1.31 , mientras que la fracción F1 fue la que presentó un porcentaje menor de mitocondrias íntegras con una media de 53.84 ± 0.57 ($P \leq 0.05$).



Grafica 3. Porcentaje de Integridad mitocondrial mediante la prueba MicrotrackerRed CMXRos® para los espermatozoides sexados por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-diatrizoato de sodio. Datos expresados como media \pm S.E.M; n=17. Prueba de T. Literales diferentes indican diferencia estadística significativa entre las fracciones obtenidas y el grupo control (sin sexar) ($P \leq 0.0001$).

En la Grafica 4 se muestra los valores obtenidos en el gradiente Optiprep®. Donde el control muestra una media de 83 ± 1.01 , donde las fracciones F1 y Anillo muestran la mayor diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) en comparación con este, mostrando valores para la media de 44.95 ± 2.54 y 44.61 ± 6.97 , respectivamente. La fracción F2 fue la que mostró menor diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) con una media de 40.74 ± 1.04



Grafica 4. Porcentaje de Integridad mitocondrial mediante la prueba MicrotrackerRed CMXRos® para los espermatozoides separados empleando el medio comercial Optiprep®. Datos expresados como media± S.E.M; n=5. Prueba de T. Literales diferentes indican diferencia estadística significativa entre las fracciones obtenidas y el grupo control (sin sexar) ($P \leq 0.0001$).

9.4 Evaluación del sexado por gradientes de densidad mediante Citometría de Flujo

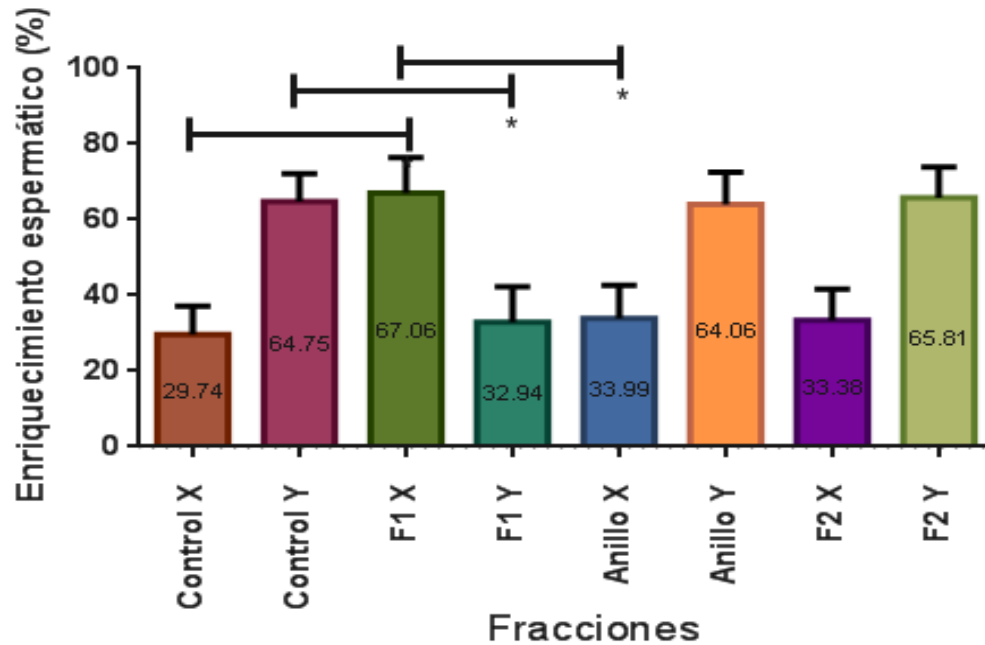
Al realizar la evaluación mediante citometría de flujo de las poblaciones espermáticas portadoras del cromosoma X y Y que fueron sometidas al gradiente de Ficoll® PM 400-diatrizoato de sodio, se encontró una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la fracción F1 con respecto a su control y a la fracción denominada Anillo para los espermatozoides con cromosoma X (Tabla. 2 y Grafica. 5) para los espermatozoides con cromosoma Y solamente se encontró diferencia en la

fracción F1 con respecto a su control (Tabla. 2 y Grafica. 5). En el caso del gradiente comercial Optiprep® no se encontraron diferencias estadísticas significativas en ninguna de las fracciones (Tabla. 2 y Grafica. 6).

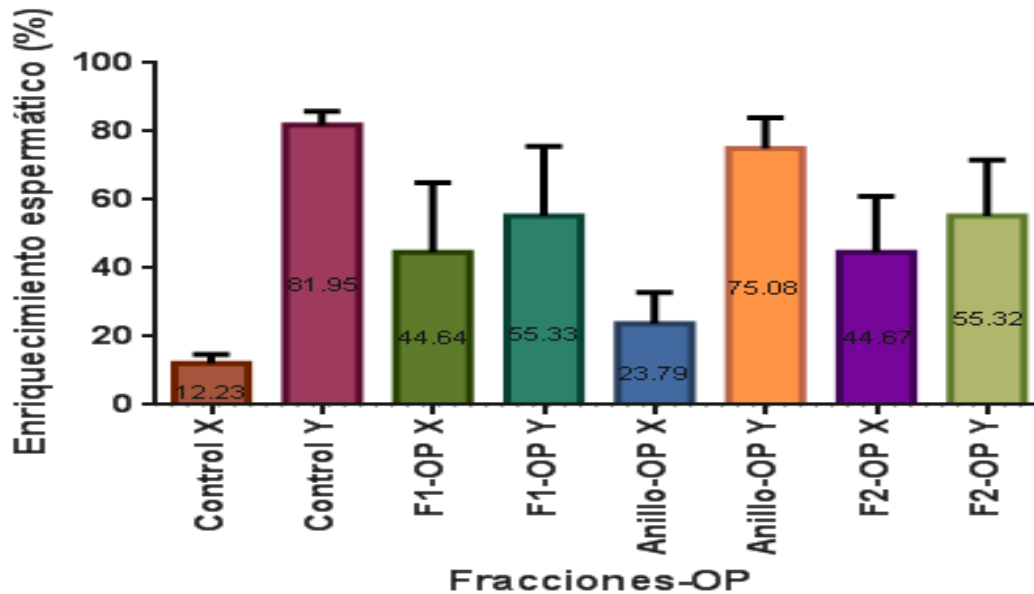
Tabla 2. Porcentajes obtenidos de la evaluación por citometría de flujo de los espermatozoides del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) sometidos al sexado por gradientes de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio (n=17) y mediante Optiprep® (n=5).

Tipo de Gradiente	Espermatozoide con cromosoma X	Espermatozoide con cromosoma Y
Ficoll-Diatrizoato de sodio		
Control	29.74±7.41 ^{ac}	64.75±7.46 ^a
F1	67.06±9.36 ^b	32.94±9.36 ^b
Anillo	33.99±8.62 ^{ac}	64.06±8.45 ^{ab}
F2	33.38±8.31 ^{abc}	65.81±8.19 ^{ab}
Optiprep®		
Control-OP	12.23±2.53 ^a	81.95±4.04 ^a
F1-OP	44.64±20.36 ^a	55.33±20.38 ^a
Anillo-OP	23.79±9.06 ^a	75.08±8.98 ^a
F2-OP	44.67±16.33 ^a	55.32±16.33 ^a

Datos expresados como media± S.E.M; n=17 para el caso del gradiente con Ficoll-diatrizoato y n=5 para Optiprep®. Prueba de T. Literales diferentes indican diferencia estadística significativa por columna (P≤0.05).



Grafica 5. Porcentaje de enriquecimiento espermático X y Y de semen sexado por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll® PM 400-Diatrizoato y evaluado mediante citometría de flujo. Datos expresados como media± S.E.M; n=17. Prueba de ANOVA (*) indica diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

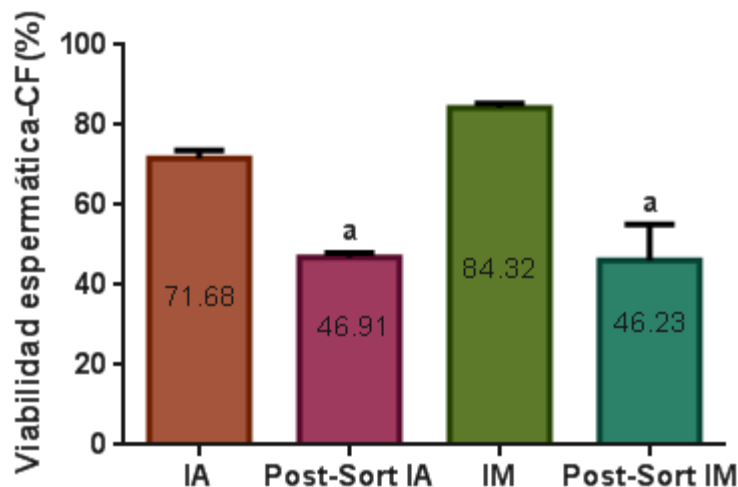


Grafica 6. Porcentaje de enriquecimiento espermático X y Y sexado con Optiprep® y evaluado mediante citometría de flujo. Datos expresados como media± S.E.M; n=5. Prueba de ANOVA (*) indica diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

9.5 Sexado mediante Citometría de Flujo

En los eyaculados en fresco se encontró un porcentaje promedio de espermatozoides con cromosoma X del 37.73% y un 62.27% para Y; al realizar el sexado por Citometria de flujo se obtuvo una eficiencia promedio en el enriquecimiento del 84% para los espermatozoides portadores del cromosoma Y y del 90% para los espermatozoides portadores del cromosoma X.

En cuanto a la valoración de la viabilidad de las células sexadas por citometría la integridad acrosomal antes del proceso fue de 71.68 ± 2.03 y posterior al sexado de 46.91 ± 1.12 ; en cuanto a la integridad mitocondrial esta fue de 84.32 ± 1.14 y 46.23 ± 8.84 antes y después del proceso, observándose diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) (Grafica. 7).



Grafica 7. Porcentaje de viabilidad espermática, después del sexado por citometría de flujo. Datos expresados como media \pm S.E.M; n=3. Prueba de T. Literales diferentes indican diferencia estadística significativa con respecto a su control (sin sexar) ($P \leq 0.05$). IA= Integridad Acrosomal, IM= Integridad Mitocondrial

X.- DISCUSIÓN

La hipótesis de este trabajo sugería que el sexado por la técnica de centrifugación en gradientes de densidad Ficoll-diatrizoato de sodio permitiría separar las poblaciones X y Y del semen del delfín nariz de botella, manteniendo una mayor viabilidad de las células en comparación con la técnica por citometría de flujo. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que bajo nuestras condiciones no se logró enriquecer las poblaciones espermáticas, contrario a lo reportado por Vázquez (2008) y Rojas (2014) quienes al usar un gradiente de Ficoll-diatrizoato de sodio reportan un enriquecimiento del 94 y 70% respectivamente.

Los eyaculados del delfín nariz de botella obtenidos en este estudio mostraron desde un inicio una tendencia hacia los espermatozoides con cromosoma Y, aun antes del proceso de sexado. Rojas (2014) menciona un 61% para los espermatozoides Y en su grupo control, contrario a la proporción 50:50 que se ha reportado en otros estudios (James, 2012), quien también menciona que al haber un desbalance en los sexos de las crías en un hato, este tiende a corregirse. Hay informes que mencionan una variación considerable en el porcentaje de espermatozoides con cromosoma Y entre los eyaculados de algunos bovinos, Chandler (2002), relacionándolo a una alta frecuencia en la colección, por lo tanto, al compararlo con los delfines, el macho se colectaba dos veces por semana lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente.

Si bien los resultados de este estudio mostraron el enriquecimiento de los espermatozoides con cromosoma X en la fracción F1 (67%) en las muestras sexadas con el gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio, esto no fue siempre constante ya que dicho enriquecimiento no se presentó en el total de las muestras estudiadas, esto ocurrió a pesar de haber controlado condiciones como la densidad específica del gradiente, el tiempo de centrifugación y la temperatura. Debido a lo anterior podríamos recomendar aumentar el número de muestras para con ello poder caracterizar el comportamiento de los espermatozoides del delfín y por lo tanto la distribución de los portadores del cromosoma X así como del cromosoma Y a través del gradiente de densidad; lo anterior también ha sido señalado en otros estudios al emplear el semen de otras especies (Vázquez, 2009; López, 2010, Chávez, 2010).

En la actualidad, se sabe que debido a la diferencia entre el contenido de DNA, el espermatozoide X, que es ligeramente más grande que el espermatozoide con cromosoma Y, podría ser colocado en la parte más profunda o densa del gradiente, esto influenciado por el tiempo de centrifugación, además cuando los espermatozoides son centrifugados a través de capas cada vez más densas de una solución, el espermatozoide X puede sedimentar en el botón y el espermatozoide Y puede migrar a la parte de arriba del tubo (Sakkas, 2000), contrario a lo observado en este trabajo.

Hasta el día de hoy, con el empleo de la centrifugación en gradiente de densidad como método de sexado, a pesar de la utilización de diferentes medios para

generarlos, se ha obtenido un enriquecimiento del 70% de espermatozoides con cromosoma X los cuales se localizan en el botón o pellet que se forma en el fondo del tubo, mientras que los espermatozoides con cromosoma Y, recuperados del sobrenadante cuentan con un enriquecimiento del 65%, lo cual fue validado por distintas técnicas, tales como hibridación *in situ* (Lange, 1995), PCR-tr (Vázquez, 2009, Resende, 2011), o a través de la inseminación *in vitro* (Vitória, 2009).

Trabajos donde utilizan un gradiente discontinuo de 10 a base de Percoll™ (con densidades entre 1.010 y 1.123 g/ml) o las mismas densidades pero con OptiPrep® han logrado 62.0% y 47.3% respectivamente de enriquecimiento de espermatozoides con cromosoma X Resende (2011), mientras que Lucio (2012) utilizando un gradiente de 3 capas, manejando las mismas densidades que Resende, obtiene un 45.2% en el desarrollo de blastocistos viables hembras, además de que el 79.4% de espermatozoides obtenidos presentan reacción acrosomal en muestras al descongelado de los mismos.

Otro punto importante a considerar y que pudo influir en los resultados obtenidos en nuestro trabajo al utilizar la centrifugación por gradiente de densidad fue la concentración espermática utilizada (160×10^6 espermatozoides/ml). Al haber una concentración elevada en el gradiente de densidad las moléculas chocan entre sí, siendo más difícil moverse en dirección opuesta, lo que interfiere con la sedimentación (Freifelder, 1991). Así pues, en algunos trabajos reportan la utilización de 40 ó 50×10^6 espermatozoides/ml (Resende, 2011; Lucio, 2011; Esmaeilpour, 2012), por lo tanto, se propone disminuir la concentración espermática utilizada para obtener un mejor resultado y optimizar la muestra.

Para este trabajo, las densidades (1.070g/ml) utilizadas tanto para el gradiente de Ficoll-diatrizoato de sodio como el Optiprep® fueron basadas a lo reportado por Harvey (1946) donde se determina la densidad del espermatozoide X y Y en el humano, el cual es muy similar en forma y tamaño al espermatozoide de delfín. Sin embargo, la forma de la cabeza del espermatozoide en algunas especies varía de aplanada a ovalada, con excepción de los roedores que presentan una forma de gancho, (Garner, 2006) lo cual ha sido relacionado directamente con la distribución del espermatozoide en el gradiente. Cuanto más largo sea el objeto o la partícula, mayor será su resistencia al movimiento, generando un mayor coeficiente de fricción (Freifelder, 1991), por lo tanto, debe considerarse realizar el cálculo específico de la densidad y masa del espermatozoide de delfín, o de cualquier especie que se pretenda utilizar para así ajustar el gradiente a una densidad exacta. Además, la célula espermática presenta motilidad el cual se ve favorecido bajo condiciones naturales en un medio viscoso (Jackson, 2011)

Por otra parte la temperatura de 18°C ha sido recomendada para tener buenos resultados en cuanto a tiempo y rendimiento al utilizar un gradiente de densidad para el sexado (Lomonte, 2009), Kanesharatnam *et al.*, 2012), sin embargo en nuestro estudio la centrifugación ocasionó la aglutinación de las células, lo que posiblemente interfirió con la validación de la técnica por el citómetro de flujo, ello a pesar de haber mantenido la temperatura antes mencionada. Otros autores sugieren utilizar temperaturas entre 22°C (Resende *et al.*, 2011), (Lucio *et al.*, 2012), o de 22°-24°C (Resende *et al.*, 2009). Por lo anterior se ha recomendado mantener una temperatura de 4°C al momento de la centrifugación y así disminuir

el porcentaje de agregación, pero a esta temperatura es necesario prolongar el tiempo de separación (centrifugación).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el uso de un gradiente de Ficoll-diatrizoato de sodio permite mantener la integridad acrosomal por arriba de un 50%. En cambio al utilizar el medio comercial Optiprep® la integridad acrosomal está por debajo de este porcentaje; al igual que las células sometidas al proceso de sexado mediante citometría de flujo. (Underwood, 2009).

El gradiente compuesto por Ficoll-diatrizoato al ser un medio osmótico de baja viscosidad, se considera un método suave favorable para los espermatozoides y por lo tanto les permite mantener su viabilidad. (Resende, 2011).

La distribución espermática a lo largo del gradiente de densidad, fue constante durante todas las repeticiones realizadas $n=17$, obteniéndose en todos los casos (F1, Anillo y F2). En la fracción F1 la concentración espermática fue de 10 a 15×10^6 células/ml, en la fracción anillo de $50-80 \times 10^6$ células/ml y por la fracción F2 de $8-10 \times 10^6$ células/ml, encontrándose que la fracción F1 presenta mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma integro (54.13%).

Sin embargo los resultados difieren con lo reportado con Rojas, 2014, donde utilizan semen de carnero, ya que menciona que la integridad acrosomal disminuye en relación a la profundidad del gradiente.

La integridad acrosomal es de gran importancia para lograr una fertilización exitosa ya sea *in vitro* ó *in vivo* (Esteves, 2011), la cual está íntimamente ligada a la reacción acrosomal, que es un fenómeno tiempo-dependiente que ocurre de

manera natural para que lleve a cabo la fertilización (Tesarik, 1995). Si este fenómeno ocurre de manera prematura o tardía, genera fallas en la fertilización. Por lo que el someter a los espermatozoides a procesos que le provocaran estrés o que le generen daños sobre la membrana plasmática o su permeabilidad, estos pueden influir negativamente en la integridad del acrosoma (Cross, 1991). Resende, (2010) menciona que el usar un gradiente de densidad como método de sexado permite recuperar espermatozoides con poco daño en el acrosoma y en la membrana plasmática, por lo que el utilizar este tipo de método garantiza la viabilidad del espermatozoide (Oliveira, 2011) y que el emplear pruebas fluorescentes resulta útil para valorar la fertilidad de manera indirecta en las diferentes especies (Marti, 2000).

En cuanto a la integridad mitocondrial, estructura que guarda una relación con la fertilidad y es considerada un organelo fundamental para la fisiología del espermatozoide (Del Olmo, 2013) observamos que la fracción F1 es la que presenta menor porcentaje (53%), siendo esta fracción la que mostró el mejor enriquecimiento para la población de espermatozoides X. En cambio en las células que fueron sometidas al proceso de sexado mediante citometría de flujo presentaron un 46%, así como el Optiprep® 46% sugiriendo que el gradiente a base de Ficoll-diatrizoato de sodio mantiene una buena viabilidad espermática.

Al valorar los medios de transporte se obtuvo un mayor porcentaje de viabilidad al utilizar el medio Vellón dorado (75%), que además de mantener a la célula viable, es un medio que cuenta con antibióticos lo cual puede ser de gran utilidad cuando

la muestra debe ser transportada por largo tiempo (no más de 4 hrs) al laboratorio donde será analizada. Sin embargo el PBS al ser un medio accesible y de fácil preparación puede ser un excelente reemplazo ya que mantiene una viabilidad mayor al 72%.

Si comparamos las técnicas en cuanto al enriquecimiento de las poblaciones espermáticas (X o Y), ambas mostraron favorecer a la población portadora del cromosoma X, esto a pesar de que los eyaculados obtenidos siempre mostraron mayor porcentaje de espermatozoides con cromosoma Y. Sin embargo la citometría de flujo mostró la mayor eficiencia para separar ambos tipos de células, lo cual coincide con lo reportado hasta hoy de ser la mejor técnica para el sexado de semen. Aunque se ha reportado daño acrosomal de un 65% en espermatozoides sexados por esta técnica (Vitória *et al.*, 2009), por esto no se debe descartar el uso de la centrifugación por gradientes de densidad, ya que haciendo las adecuaciones pertinentes podría ser utilizada de manera rápida y sencilla.

Finalmente el uso de la citometría de flujo como herramienta de validación permitió evaluar de forma rápida y precisa la proporción de espermatozoides con cromosoma X y Y, pero es necesario una estandarización previa y específica para las diferentes especies tanto domésticas como de fauna silvestre. Aunque es necesario evaluar todas las limitantes que representa el uso de esta tecnología para los espermatozoides en particular, ya que se requiere de un citómetro que realice dicha separación celular, que cuente con un láser violeta, y además para

tener mayor eficiencia requiere de una aguja que presente una orientación de 90° para poder direccionar mejor a los espermatozoides dada la forma que presentan (flagelo) (Pinkel, 1982). También es necesario utilizar un fluido interno a base de Tris (BSA, Tris, antibióticos, citrato de sodio y ácido cítrico) (O'Brien, 2003), empleando una presión interna de 40 a 50 psi (libras por pulgada cuadrada) para incrementar la supervivencia de los gametos a separar (Suh, 2003), así como un operador entrenado para esto.

Teniendo esto en cuenta, la citometría de flujo resulta una técnica eficiente en el campo de la Medicina Veterinaria, ya que puede no solo emplearse en el área de reproducción animal, sino que puede ser de gran utilidad en el diagnóstico clínico (Seidel, 2003).

XI.- CONCLUSIONES

El sexado por la técnica de centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-diatrizoato de sodio bajo las condiciones empleadas en el presente estudio permitió, aunque no de manera constante, enriquecer la población de espermatozoides portadores del cromosoma X del semen de delfín nariz de botella y aunque la viabilidad de las células fue mejor en comparación con la técnica por citometría de flujo, esta última fue más eficiente para la separación espermática.

El gradiente comercial Optiprep®, no es recomendable para separación de las poblaciones espermáticas, ya que además de no enriquecer ninguna de las poblaciones disminuye la viabilidad de las células.

Es necesario hacer modificaciones a la técnica de centrifugación en gradientes de densidad, específicas para cada especie, tales como:

- a) Obtener la densidad específica del espermatozoide del delfín nariz de botella.
- b) Disminuir la temperatura de centrifugación
- c) Disminuir la concentración espermática sometida al gradiente, 40×10^6 células/ml.

XII. - REFERENCIAS

1. CRUZ G. Evaluación de la eficiencia de un equipo de Citometría de flujo y dos fluorocromos para el sexado de semen congelados en bovinos. Tesis de Maestría en ciencias, FMVZ-UNAM, 2005.
2. DE GRAAF, SP, Evans G, Guillan L, Guerra MMP, Maxwell WMC, O'Brien JK. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, 67:217-227, 2007.
3. DE GRAAF SP, Leahy T, Marti J, Evans G, Maxwell W.M.C. Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation. *Theriogenology*. 70: 1360–1363, 2008.
4. EDDY, E.M., The spermatozoon, In the physiology of reproduction (Knobil, E., Neill, J.D., *et al.*, eds) pp 27-68, Raven Press, NY. 1988.
5. ERICKSSON RL, Langevin CN, and Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature (London)*, 246:421-424, 1973.
6. FLORES E. JM Fernández-Novell, A. Peña, J.E. Rodríguez Gil. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structure of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 72, 784-797, 2009.
7. FENG-PANG C, Alireza Fazeli, Wim F. Voorhout, Abraham Marks, Mart M. Bevers, Ben Colenbrander. Use of peanut Agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*, 17:6, 1996.

8. GARNER DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*. 65:943-957, 2006.
9. GEORGE E, Seidel J. sexing mammalian sperm intertwining of commerce, technology and biology. *Animal reproduction Science*, 79:145-156, 2003.
10. GREEN CE, Watson PF. Comparision of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001; 122:889-898.
11. GUTIERREZ PO. Valoración in vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, criopreservado en diluyentes formulados con Trehalosa y una baja concentración de glicerol. Tesis Doctorado en Ciencias. FMVZ-UNAM, 2009.
12. HOHENBOKEN WD. Applications of sexed in cattle production. *Theriogenology*. 52:1421-1433,1999.
13. HOLLINSHEAD FK, Gillan L, O'Brien JK, Evans G, Maxwell WMC. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod. Fertil. Dev*, 15:351-359, 2003.
14. HOLLINSHEAD, FK, O'Brien jK, Maxwell WMC, Evans G. Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology*, 62:958-968, 2004.
15. JIMÉNEZ I. González Márquez Humberto, Ortiz Rocío, Herrera José Antonio. García Adelfa, Betancourt Miguel, Fierro Reyna. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 59:1171-1180, 2003.

16. JONHSON L, Welch G. sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*. 52:1323-1341, 1999.
17. KARP G. *Biología celular y molecular*. Mc-Graw Hill, 5ª edición. 2005.
18. LOMONTE B. *Técnicas de laboratorio en Inmunología Clínica*, Universidad de Costa Rica, 122, 2009.
19. LÓPEZ, L.G.U, *Valoración de la eficiencia de la centrifugación en gradientes de densidad para el sexado de espermatozoides sobre el sexado de las crías en ovinos*. Tesis de Maestría en Ciencias, UNAM-FMVZ.2010.
20. MAYER S.A *Review of the Scientific Justifications for Maintaining Cetaceans in Captivity. A Report for the Whales and Dolphins Conservation Society (WDCS)*. February 1998.
21. Merck Index, 12th ed., Entry# 3040.
22. MICHAEL A, Alexopoulos C, Pontiki , Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscos C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. 68: 204–212, 2007.
23. MONTERO, L de Guevara, *Métodos de Centrifugación*. 2001.
 - a. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf>

24. MONTROYA U.A, Ten Morro, J1, Mendiola Olivares J, Guerrero Villena, J, Bernabeu, Pérez, R. Utilidad de las lectinas en el estudio de espermatozoides. *Fertilidad*, 25: 4, 2008.
25. NAITANA S. Ledda S .Leoni G. Bogliolo L. Loi P. Cappai P .Membrane integrity and fertilizing potential of cryopreserved spermatozoa in European mouflon. *Animal Reproduction Science*. 52: 105–112.1998.
26. Norma Oficial Mexicana 135 de la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003.
27. O'DONNELL JM. Intracellular levels of sodium and potassium in bull spermatozoa in relation to cell metabolism. *J. Reprod Fert*. 19,207-209, 1969.
28. Pabst DA, Rommel SA, McLellan WA, Williams TM, and T. K. Rowles TK. Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise. *J. of Exp Biol* 1999; 198: 221-226.
29. PEÑA FJ, Rodriguez Martínez H, JA Tapia, C. Ortega Ferrusola, L. González Fernández and B Macías García. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Dom Anim*, 44, 345-349, 2009.
30. PEI-HSUAN Hung, Marion G. Miller, Stuart A. Meyers, and Catherine A. VandeVoort. Sperm Mitochondrial Integrity Is Not Required for Hyperactivated Motility, Zona Binding, or Acrosome Reaction in the Rhesus Macaque. *Biology of reproduction*. 79: 367–375 .2008.
31. RICKWOOD D. Centrifugation. A practical approach. IRL Press. Oxford, England. 82-87. 1989.

32. RODRIGUEZ MH. State of the ART of farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev*, 19, 91-101, 2007.
33. ROJAS, NYG. Centrifugación de semen ovino en Ficoll® PM 400-diatrizoato de sodio para su sexado y uso en la inseminación artificial. Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM, 2011.
34. Robeck TR, , KJ Steinman, M Yoshioka, Jensen E, O'Brien, E Katsumata, C Gili, McBain JF, Sweeney J and Monfort SL. Estrus cycle characterization and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reproduction and Fertility* 2005:1741-7899.
35. Robeck TR, O'Brien J. Development of sperm sexing and associated reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) *Reproduction, Fertility and Development*, 2006; 18:319-329.
36. Robeck TR, Shannon K.C. Atkinson, and Brook F. Reproduction. In DIERAUF LA, GULLAND FMD, editors. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* 2nd ed. United States of America: CRC Press, 2001: 193-236.
37. SEIDEL Jr. GE, Garner DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 124:733-743, 2002.
38. SCHENK JL, Suh TK, Cran DG, Seidel Jr. GE. Criopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 52: 1323-1341, 1999.

39. SCHICK, C. S., and Haller, C., Comparative cytotoxicity of ionic and non-ionic radiocontrast agents on MDCK cell monolayers in vitro. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 14(2), 342-347 (1999).
40. Schroeder, J.P. (1985) Artificial Insemination of the Bottlenose Dolphin, - *Tursiops truncatus*. In: Abstracts and Papers, 1985 Annual Meeting, American Association of Zoo Veterinarians, (M.S. Silberman, D.V.M. and S.D. Silberman, eds.), pp 122-124.
41. SUH TK, Schenk JL. Pressure during flow sorting of bull sperm affect post-thaw motility characteristic. *Theriogenology*, 59:516, 2003.
42. TEJEDA A. Montesinos R.M. Guzmán R. *Bioseparaciones*. ed. Unison, Hermosillo, Sonora, México. 1995.
43. VÁZQUEZ A. Sexaje de espermatozoides de bovino mediante centrifugación en gradientes de densidad. Tesis de licenciatura, FMVZ-UNAM. 2008.
44. VÁZQUEZ J, Parrilla I, Roca J, Gil M, Cuello C, Vazquez J, Martinez E. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology*, 71:80-88, 2009.
45. YESCAS ZO, Distribución de los dominios de membrana por daño en la teca perinuclear en el semen criopreservado de cerdo. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, UNAM-FMVZ, 2006.
46. WOOD, F.G.: Birth of Porpoises at Marineland, Florida, 1939 to 1969, and comments involved in Captive Breedings of Small Cetacea. *Breedings Dolphins; present status, suggestions for the future*. Edited by Ridgway,

S.H. and Benirschke, K; 47-60, Rep Mar Mamm Comn; Washington,
D.C.(USA),1977.