



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

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

**VALORACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA  
CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTES DE DENSIDAD PARA  
EL SEXADO DE ESPERMATOZOIDES SOBRE EL SEXO DE  
LAS CRIAS EN OVINOS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**GERMAN UBALDO LÓPEZ LÓPEZ**

**TUTOR: MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA**

**COMITÉ TUTORAL: ALEJANDRO CÓRDOVA IZQUIERDO**

**JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ**

**MÉXICO, DF. 2010.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

**A DIOS:** por todo lo que me ha dado y permitirme ser lo que soy.

**A LA VIRGEN:** por todas sus bendiciones y fortaleza que me ha dado.

**A MIS PADRES:** por darme la vida y ser el impulso más grande para seguir adelante.

**A MIS HERMANOS:** por compartir todos los bellos momentos de la vida y motivarme a cumplir mis sueños.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la FMVZ-UNAM por todo el apoyo recibido para realizar mis estudios de maestría.

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios

A la Dra. Lourdes Juárez por su enseñanza y permitirme ser parte de su grupo de investigación.

Al Dr. Alejandro Córdova por sus conocimientos y consejos que amablemente me compartió.

Al Dr. Medrano por su disponibilidad y apoyo.

Al Dr. Octavio Mejía por todo el apoyo incondicional y conocimientos compartidos.

A los miembros del jurado Dr. Cornejo por su amabilidad y comentarios, Dra. Norma Delgado por sus comentarios tan acertados, Dr. Jesús Romero por sus observaciones.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio Oscar, Maye, Ara, Itza, Beto, Ángel, Sandy y Male, por todo su apoyo y consejos en los momentos difíciles.

A mis grandes amigos Lupe y Luis, que siempre me apoyaron incondicionalmente y me motivaron a seguir.

A mis papas y hermanos, por ser el mayor impulso en la vida.

A todos mis amigos del HVC que siempre me apoyaron y motivaron a seguir adelante

## INDICE

<b>III Introducción</b>	1
3.1 Determinación del sexo	2
3.2 Diferencias entre espermatozoides X y Y	6
3.2.1 Cuerpo F	7
3.2.2 Motilidad	8
3.2.3 Proteínas de superficie	8
3.2.4 Tamaño y forma	8
3.2.5 Contenido de ADN	9
3.3 Técnicas de sexaje de espermatozoides	10
3.3.1 Citometría de flujo	10
3.3.2 Centrifugación	13
3.3.2.1 Tipos de centrifugación	14
3.3.2.2 Gradientes	15
3.3.2.3 Centrifugación en gradientes de densidad	16
3.4 Manipulación del ciclo estral de la oveja	17
3.4.1 Proestro	20
3.4.2 Estro	21
3.4.3 Metaestro	22
3.4.4 Diestro	22
3.4.5 Sincronización de estro	22
3.4.6 Inseminación artificial	24
<b>IV Justificación</b>	26
<b>V Objetivo general</b>	27
<b>VI Objetivos específico</b>	27
<b>VII Hipótesis</b>	27
<b>VIII Material y métodos</b>	28

Localización -----	28
Animales -----	28
Sincronización de estros -----	28
Obtención de semen -----	29
Motilidad en masa -----	30
Motilidad progresiva -----	30
Evaluación de la integridad de la membrana espermática -----	31
Evaluación del estado de la capacitación -----	32
Prueba Hiposmótica-azul de Coomassie -----	33
Sexado se semen -----	34
Inseminación intrauterina -----	35
Análisis estadístico -----	36
<b>IX Resultado -----</b>	<b>37</b>
<b>X Discusión -----</b>	<b>44</b>
<b>XI Conclusiones -----</b>	<b>49</b>
<b>XII Referencia -----</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig 1</b>	Determinación del sexo en mamíferos -----	3
<b>Fig 2</b>	Desarrollo del fenotipo sexual del macho -----	5
<b>Fig 3</b>	Desarrollo del fenotipo sexual de la hembra -----	6
<b>Fig 4</b>	Diferencias en el contenido del DNA entre los espermatozoides X y Y -----	9
<b>Fig 5</b>	Esquema generalizado del citómetro de flujo -----	12
<b>Fig 6</b>	Tipos de centrifugación -----	15
<b>Fig 7</b>	Eventos foliculares en el ciclo de la oveja -----	19
<b>Fig 8</b>	Ovejas con esponjas vaginales -----	29
<b>Fig 9</b>	Espermatozoides teñidos con Eosina-Nigrosina -----	31
<b>Fig 10</b>	Espermatozoides teñidos con Clortetraciclina -----	33
<b>Fig 11</b>	Espermatozoides con prueba Hiposmotica-Azul de Coomassie -----	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Diferencias entre espermatozoides X y Y -----	7
<b>Tabla 2</b>	Clasificación de la motilidad en masa espermática -----	30
<b>Tabla 3</b>	Patrones de tinción para CTC -----	32
<b>Tabla 4</b>	Porcentajes de espermatozoides vivos y muertos -----	37
<b>Tabla 5</b>	Motilidad progresiva de semen no sexado y sexado -----	39
<b>Tabla 6</b>	Funcionalidad de la membrana y estado del acrosoma -----	41
<b>Tabla7</b>	Evaluación del estado fisiológico de espermatozoides -----	42
<b>Tabla8</b>	Porcentajes de fertilidad con semen no sexado y sexado -----	43
<b>Tabla 9</b>	Prolificidad con semen no sexado y sexado -----	44

## **ABREVIATURAS**

ADN	Acido Desoxirribonucleico
CEIEPO	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina
CLs	Cuerpos Lúteos
CTC	Clortetraciclina
E2	Estrógenos
eCG	Gonadotropina Corionica equina
EN	Eosina Nigrosina
FDT	Factor Determinante de testículo
FGA	Acetato de Fluorogestona
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GnRH	Hormona Liberadora de gonadotropinas
IA	Inseminación Artificial
Kg	Kilogramo
LH	Hormona Luteinizante
M	Molar
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
Mcal	Mega caloría
Mg	Miligramo
P4	Progesterona
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PgF2 $\alpha$	Prostaglandina F dos alfa
rpm	Revoluciones por minuto
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida

## I.- RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia y capacidad fecundante *in vivo* de espermatozoides de ovino sexados por densidad de gradientes con Ficoll-Diatrizoato de Sodio. Se utilizaron 60 ovejas de raza Suffolk con una edad promedio de 1 año; que fueron sincronizadas con esponjas vaginales con 20 mg de acetato de fluorogestona y al ser retiradas 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG). A las 48 horas posteriores al retiro de esponjas fueron inseminadas por laparoscopia con dos dosis de semen cada una. La mitad de las hembras (n=30) fueron inseminadas con semen sin sexar y la otra mitad (n=30) con semen sexado con cromosoma X. El semen se obtuvo de 2 machos Suffolk con edad de 3 años y fertilidad probada, mediante vagina artificial. El semen fue lavado en PBS y centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos y se dividió en dos fracciones, una fue utilizada como control (semen no sexado) y la otra fue sexada en gradientes de Ficoll-Diatrizoato de sodio, siendo la concentración ajustada a  $160 \times 10^6$  espermatozoides/ml en PBS en tubos de vidrio de 10 ml. Se colocó 1 ml de muestra sobre un colchón de 2.4 ml de Ficoll al 8 % en PBS mezclada con 1 ml de Diatrizoato de sodio al 32.8 % en PBS y fueron centrifugadas a 700 rpm durante 20 minutos, la pastilla fue recuperada y lavada con PBS. Posteriormente, se resuspendió en un diluyente comercial para semen y se envaso en pajillas de 0.25 ml a una concentración de  $20 \times 10^6$  de espermatozoides. El diagnóstico de gestación se realizó a los 60 días post-inseminación mediante ultrasonido de imagen y el sexo de las crías se determinó al nacimiento. Se utilizó chi cuadrada para evaluar la proporción de fertilidad para las ovejas inseminadas con semen sexado fue de 23.3 % y significativamente ( $P < 0.05$ ) menor al grupo control 73.3 %. El sexo de las crías fue 54.1 % machos y 45.8 % hembras, para semen no sexado, mientras que para semen sexado fue de 50 % machos y 50 % hembras, no habiendo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). Los resultados obtenidos indican que la centrifugación en gradientes de densidad, no enriquece la población de espermatozoides con cromosoma X y que provoca daños al espermatozoide que afectan su capacidad fecundante.

**Palabras claves:** Sexado de semen, Centrifugación, Gradientes de densidad, Inseminación.

## II.- ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the efficiency and in vivo fertilizing capacity of ram sperm sexed by density gradient with Ficoll-sodium diatrizoate. Sixty Suffolk ewes with one year old were treated with intravaginal pessary impregnated with 20 mg fluorogestona acetate for 9 days and were administered 200 IU equine chorionic gonadotropin (eCG). At 48 hours after were inseminated by laparoscopy with two doses of semen. Half of the ewes (n = 30) were inseminated with unsexed semen and the other half (n = 30) with X chromosome-sexed semen. The semen was obtained from 2 Suffolk ram with 3 years old and fertile by artificial vagina. The semen was centrifuged in PBS at 2500 rpm for 5 minutes and was divided into two portions, one was used as control (unsexed semen) and the other was sexed on gradients of Ficoll-sodium diatrizoate, the concentration adjusted to  $160 \times 10^6$  sperm / ml in PBS in glass tubes of 10 ml. Placed 1 ml of sample on a cushion of 2.4 ml of 8% Ficoll in PBS mixed with 1 ml of sodium diatrizoate 32.8% in PBS and were centrifuged at 700 rpm for 20 minutes, the pellet was recovered and washed with PBS. Subsequently resuspended in a commercial semen extender and packaged in straws of 0.25 ml at a concentration of  $20 \times 10^6$  spermatozoa. Pregnancy was confirmed at 60 days post-insemination by ultrasound imaging and the sex of the offspring was determined at birth. Chi square was used to assess the fertility rate for ewes inseminated with sexed semen was 23.3% and significantly ( $P < 0.05$ ) lower than control group 73.3%. The sex of the offspring was 54.1% males and 45.8% females for unsexed semen, while for sexed semen was 50% male and 50% females, there being no significant difference ( $P > 0.05$ ). The results indicate that the density gradient centrifugation, does not enrich the population of sperm with chromosome X and causes damage affecting sperm fertilizing capacity.

**Key words:** Sexed semen, Centrifugation, Density gradient, Insemination.

### III INTRODUCCIÓN

La necesidad de optimizar la producción animal a través del mejoramiento genético, ha provocado un impulso en la investigación de diversas biotecnologías en el campo de la reproducción (Johnson, 2001). Dentro de estas se incluyen la inseminación artificial, la transferencia de embriones producidos *in vitro* e *in vivo* y el sexado de semen (Ordoñez 2005). Respecto a la posibilidad de determinar el sexo de la descendencia antes de la concepción, no solo en los animales domésticos sino también en la especie humana, ha sido una idea que ha ocupado la mente del hombre desde hace miles de años. Los primeros intentos realizados en este sentido se describen en la época de los antiguos filósofos griegos y eran basados en la mitología, las supersticiones o creencias populares, como comer carne roja o beber sangre de león (Campus *et a.*, 1995).

Las primeras evidencias científicas convincentes sobre la determinación del sexo del individuo llegan en el siglo XX con el descubrimiento de los cromosomas sexuales y el de su papel principal en dicha determinación (Guyer, 1910).

Hoy en día, el deseo de seleccionar el sexo de la progenie sigue vigente y ha trascendido hasta la zootecnia, ya que el poder seleccionar el sexo de la progenie es una herramienta que permite aumentar la eficiencia reproductiva (Vázquez, 2008).

Con el propósito de mejorar la genética de los individuos, en la ganadería se ha empleado cruce de individuos con características hereditarias selectivas, mas aún los cruzamientos naturales han sido desplazados por la Inseminación Artificial (IA), que ofrece la ventaja de disminuir los costos involucrados a la selección única de un macho para la obtención de progenie de alto valor genético. Sin embargo una de las limitantes más importantes hasta el día de hoy en la producción, es el desconocimiento del sexo que tendrá la descendencia, siendo uno de los principales parámetros a manipular por medios biotecnológicos (Seidel *et al.*, 2005). Es por ello que tiene gran interés la manipulación de los espermatozoides

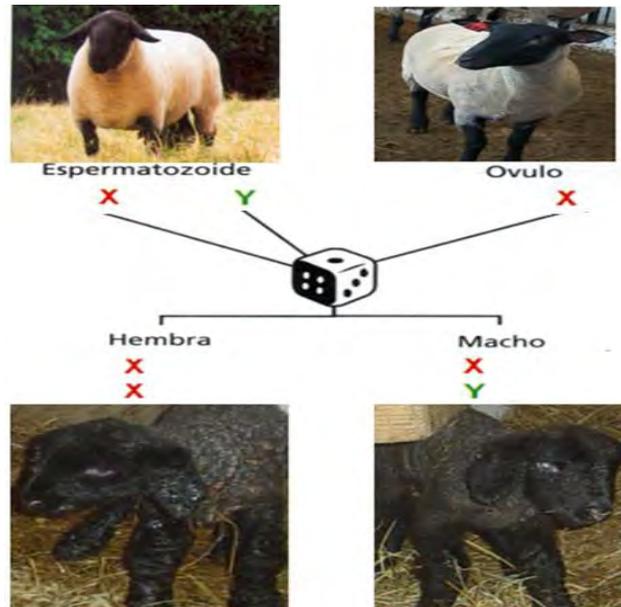
para sexar el semen, y lograr una separación de las dos poblaciones de espermatozoides; los portadores del cromosoma X y los portadores del Y, tanto en animales como en humanos (Aysa *et al.*, 2005).

Basado en los cromosomas que portan los espermatozoides, se han desarrollado técnicas para su sexado, buscando un método eficaz que permita la separación de fracciones ricas en espermatozoides X o Y y que permita mantener su viabilidad. De los numerosos métodos o técnicas que se han desarrollado, muchos de ellos no han sido exitosos a nivel comercial, ya sea porque ofrecen resultados poco satisfactorios o escasa repetitividad (Luderer *et al.*, 1982). Entre ellas la separación de las poblaciones por citometría de flujo ofrece altos índices de confianza, ya que se basa en la diferente fluorescencia que emiten los espermatozoides tras la tinción del ADN, diferencia explicada por la cantidad de ADN que contienen el cromosoma X y el cromosoma Y (Aysa *et al.*, 2005), pero presenta inconvenientes tales como alto costo y bajo porcentaje de éxitos, mismos que han limitado su utilización a nivel de campo. Por lo tanto es necesario abrir nuevas líneas de investigación o continuar con otras que han sido abandonadas, con el fin de estandarizar alguna técnica que solvete los inconvenientes de la citometría de flujo y con la posibilidad de ser aplicada a gran escala (Flaherty *et al.*, 1997).

### **3.1 Determinación del sexo**

En los mamíferos placentados, el establecimiento del sexo ocurre en el momento de la fertilización (Díaz y Merchant, 2008). En 1959, la presencia del cromosoma Y fue identificado como un factor determinante del sexo en humano y ratones (Sekido y Lovell, 2008). Hoy se sabe que en los mamíferos, el sexo está determinado por el sistema XY, es decir los machos son heterocigotos XY, mientras que las hembras son homocigotas XX, por lo que el fenotipo masculino está dado por la presencia del cromosoma Y. Durante el proceso de división celular de los gametos, el material genético debe volverse haploide a fin de que la fecundación restaure el complemento diploide; así como producto de la meiosis,

las hembras solo producen gametos con cromosoma X y los machos producen gametos con cromosoma X o Y (Figura 1) (Parrilla *et al.*, 2005).

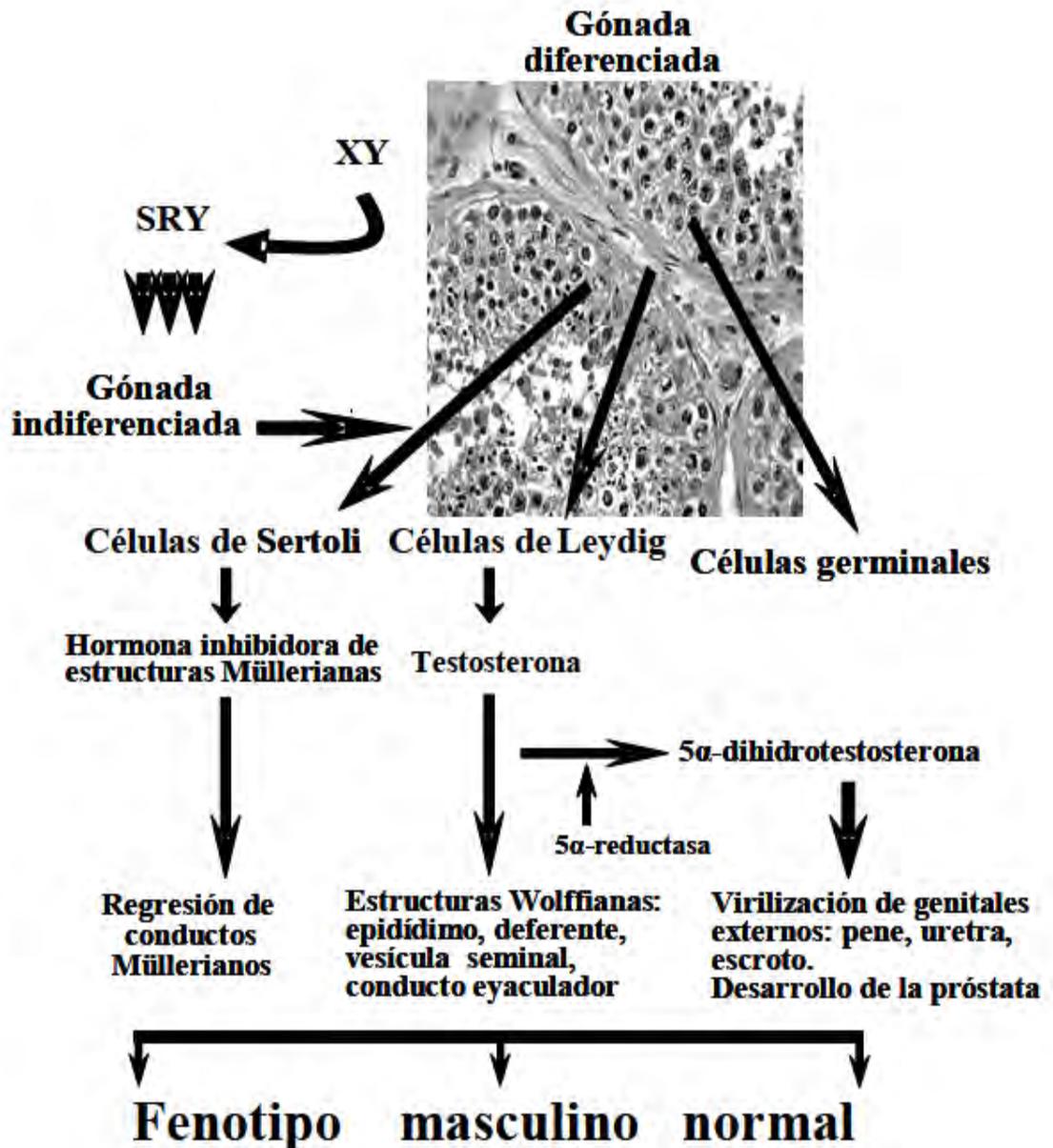


**Fig. 1.** Determinación del sexo en mamíferos. El sexo en los mamíferos se determina al momento de la fecundación, siendo el espermatozoide el que determine el sexo, si el ovocito es fertilizado por un espermatozoide con cromosoma X la cría será una hembra y si es fertilizado por uno con cromosoma Y la cría será un macho.

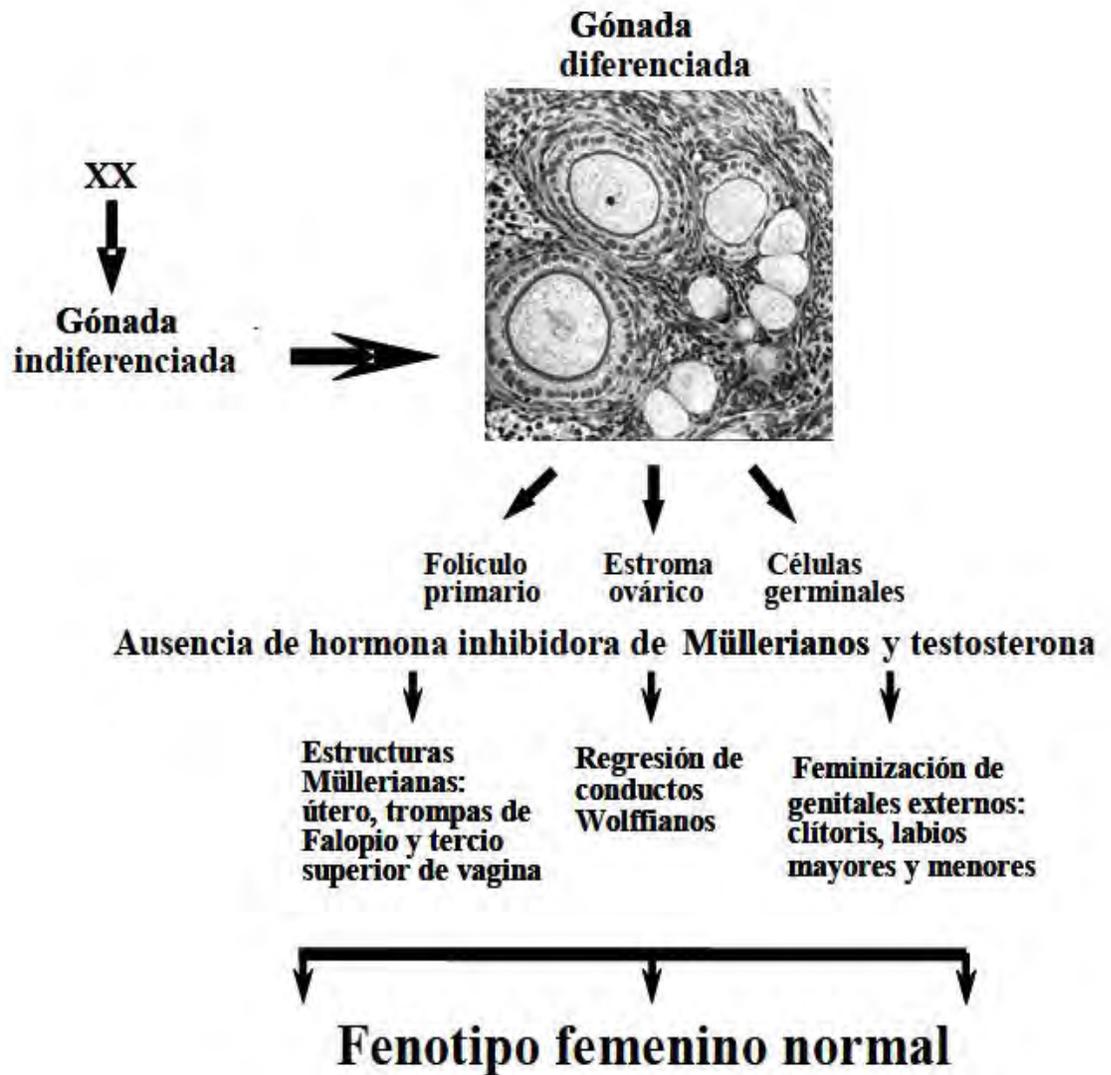
Tempranamente en la vida fetal las crestas gonadales indiferenciadas en las hembras se diferencian como ovarios y en los machos como testículos (Figura 2 y 3) (Díaz y Merchant, 2008). El desarrollo de testículos es inducido por la presencia de un gen localizado en el cromosoma Y (Campus *et al.*, 1995). Específicamente es el gen SRY, el que actúa a manera de “un interruptor” e inicia la determinación de las células de las gónadas a diferenciarse a testículos, al desencadenar la vía de expresión de diversos genes involucrados en el proceso de la determinación sexual, por ello su producto es considerado el factor determinante de testículo (FDT). En términos celulares, el gen SRY se le ha relacionado con la diferenciación de la células de Sertolli (Burgoyne *et al.*, 1988), con la migración de

las células del mesonefros a las crestas genitales (Buehr *et al.*, 1993) y con la proliferación de las células en la crestas genitales (Schmal *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha sugerido que probablemente el gen SRY sólo participe de manera indirecta en tales funciones, ya que en el ratón, el fenotipo de la células de Sertoli, su migración y proliferación ocurre después de los 11.5 días post-coito, cuando el pico de expresión de este gen ha finalizado (figura 2). Por lo que se propone que genes que se expresan después del SRY, inducen y mantienen el desarrollo del testículo. Es el gen Sox9, es que se postula como un fuerte candidato, ya que su expresión es necesaria y suficiente para promover y mantener la diferenciación del testículo en hembras transgénicas (Kidokoro *et al.*, 2005)

La última etapa de la determinación sexual es a la que se le denominó “determinación sexual somática”, y se refiere a la diferenciación sexual de los conductos de Wolff y seno urogenital; precursores embrionarios de los tractos genitales internos y externos respectivamente (Díaz y Merchant 2008).



**Fig. 2** Desarrollo del fenotipo sexual del macho. Donde se observa que el gen SRY, es el que inicia la determinación de las gónadas indiferenciadas a diferenciarse testículos para establecerse el fenotipo sexual del macho (Kofman-Alfaro y Queipo, 2005).



**Fig. 3** Desarrollo del fenotipo sexual de la hembra. En ausencia del gen SRY las gónadas indiferenciadas, se diferencian a ovarios y se establece el fenotipo sexual de la hembra (Kofman-Alfaro y Queipo, 2005).

### 3.2 Diferencias entre espermatozoides X y Y

A partir de que se determinó que los gametos masculinos eran los que determinaban el sexo en los mamíferos, se comenzaron a estudiar las diferencias entre los espermatozoides portadores del cromosoma X de los espermatozoides

portadores del cromosoma Y (Seidel, 2003). Se han reportado varias diferencias entre espermatozoides con cromosoma X y Y. (Tabla 1)

**Tabla 1.** Diferencias existentes entre los espermatozoides X y Y, utilizadas por diferentes autores como base para la separación espermática (modificada por Johnson, 1995).

<b>Parámetro</b>	<b>Diferencia entre X y Y.</b>	<b>Referencia</b>
<b>Cuerpo F</b>	Brazo largo del cromosoma Y.	Barlow y Vosa, 1970.
<b>Carga superficial</b>	Espermatozoides X migran al cátodo.	Kiddy y Hafs, 1971. Kaneko <i>et al.</i> , 1984. Mohri <i>et al.</i> , 1987.
<b>Motilidad</b>	Mayor rapidez del espermatozoide Y.	Ericsson <i>et al.</i> , 1973. Ericsson, 1999.
<b>Superficie del espermatozoide</b>	Existencia antígeno H-Y en el espermatozoides Y. Presencia de una proteína específica del sexo (SSPs)	Hendriksen <i>et al.</i> , 1993. Hoppe y Koo, 1984. Howes <i>et al.</i> , 1997.
<b>Tamaño</b>	Mayor tamaño del espermatozoide X.	Cui y Mathew, 1993. Van Munster <i>et al.</i> , 1999.
<b>ADN</b>	Mayor contenido de ADN en el espermatozoide X.	Pinkel <i>et al.</i> , 1982. Moruzzi, 1979. Johnson <i>et al.</i> , 1989. Johnson, 1991. Cran <i>et al.</i> , 1995.

### 3.2.1 Cuerpo F

Barlow y Vossa (1970) reportan que el brazo largo del cromosoma Y del espermatozoide humano emite mayor fluorescencia que el resto de los cromosomas mediante la tinción con un fluorocromo (quinacrina), esto se observa como un punto de mayor fluorescencia en la cabeza de los espermatozoides con cromosoma Y, al que se le denomina cuerpo F o cuerpo Y (Beernik *et al.*, 1993).

### **3.2.2 Motilidad**

Se ha reportado que el espermatozoides con cromosoma Y, tiene una mayor rapidez en su motilidad debido a su menor tamaño (Ericcson, 1999).

### **3.2.3 Proteínas de superficie**

En los años 50's, Ernst Erchawald encontró que los machos presentan una proteína sobre la superficie de la membrana celular, ausente en las hembras. Esta proteína se denominó antígeno de histocompatibilidad Y (antígeno H-Y); también se ha propuesto la existencia de una proteína específica del sexo (sex specific protein SSPs) e inclusive se señalado que el gen que la codifica está localizado en el cromosoma Y (Peter *et al.*, 1993, Johnson *et al.*, 2005).

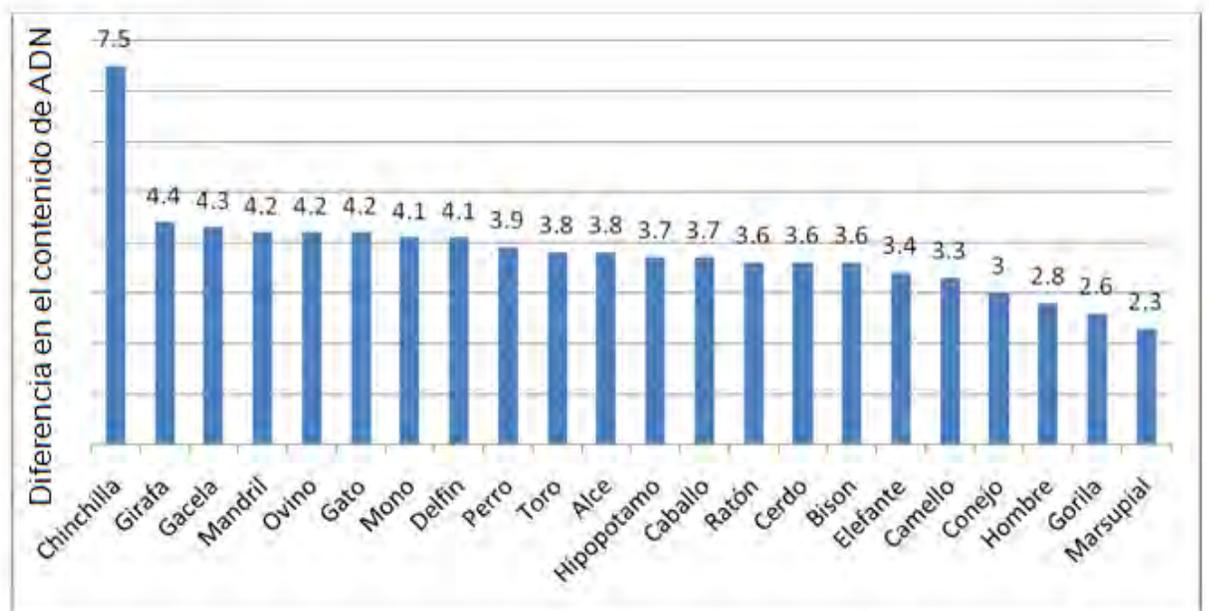
### **3.2.4 Tamaño y forma**

Un atributo importante que difiere entre los espermatozoides de los mamíferos es la forma de la cabeza. Los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos domésticos, presenta una cabeza ovalada, con excepción de los roedores (Garner, 2006). Van Muster *et al.*, (1999) demostraron que el volumen de los espermatozoides de bovino con cromosoma X es aproximadamente 1 % mayor que los Y (Seidel, 2003). Mientras que en esta misma especie, el espermatozoide con cromosoma X, es más grande entre un 2.9 y 4.2 % que el cromosoma Y (Campus *et al.*, 1995).

Por otra parte, Cui y Mathews (1993) reportaron que la cabeza de los espermatozoides X de humano es más larga y ancha que la de los espermatozoides Y (Seidel, 2003). Van Muster *et al.* (1999) determinaron que el volumen de la cabeza de los espermatozoides X, presentan una variación estadísticamente significativa, siendo 4 % mayor al de la cabeza de los espermatozoides Y. Esto ha permitido pensar que los espermatozoides X, al ser más pesados sedimentaran más rápido que los espermatozoides Y, al ser sometidos a un campo centrifugo.

### 3.2.5 Contenido de ADN

La documentación inicial de las diferencias del contenido de ADN fue establecido en espermatozoides de humano (Garner, 2006). Mediante el empleo de citometría de flujo se midió el contenido de ADN de los espermatozoides. De esta manera se evidenció una pequeña diferencia mayor de ADN de los espermatozoides portadores del cromosoma X con respecto a los portadores del cromosoma Y. La diferencia en el contenido de ADN, entre los espermatozoides X y Y, varía entre las especies y en ocasiones entre las razas (Figura 4) (Parilla *et al.*, 2005, Garner, 2006).



**Fig. 4** Diferencias en el contenido de ADN entre los espermatozoides X y Y, de diferentes especies, siendo de 4.2 % para el ovino (Adaptado por Garner, 2006).

### **3.3 Técnicas de sexaje de espermatozoides**

En la determinación del sexo de la descendencia antes de la concepción, se agrupa a todos los métodos, que basándose en la diferencia existente entre los espermatozoides X y Y, son capaces de modificar la proporción natural de individuos machos y hembras, esto es mediante la separación de los espermatozoides de cromosoma X de los portadores del cromosoma Y (Parilla *et al.*, 2005).

Por otra parte la selección del sexo de la descendencia se puede realizar mediante dos tipos de técnicas:

- Selección preconcepcional, consiste en la selección de espermatozoides X o Y, que son los que determinan el sexo del embrión. Que como ya se menciona agrupa a todas las técnicas que basadas en las diferencias existentes entre los espermatozoides X y Y, capaces de modificar la proporción natural de individuos machos y hembras, mediante la separación de espermatozoides X de los Y.
- Selección preimplantacional, consiste en determinar el sexo de los embriones y seleccionar los XX o XY. La fertilización *in vitro* y la determinación del sexo de los embriones producidos antes de la transferencia es el único procedimiento que permite seleccionar el sexo antes de la implantación (Vázquez, 2008).

Realizar la selección preconcepcional es el método más eficaz para obtener la descendencia del sexo deseado (Jonhson, 2000). En la actualidad, solo un procedimiento ha tenido la eficiencia para fines comerciales. Este procedimiento se basa en el contenido del ADN de cada espermatozoide detectado por la fluorescencia emitida por el ADN teñido con un fluorocromo (Seidel, 2003).

#### **3.3.1 Citometría de flujo**

La citometría de flujo, es el único método validado para la preselección del sexo en una gran variedad de animales incluyendo conejos, cerdos, bovinos, ovinos, equinos, búfalos, elefantes, delfines, perros, gatos y humanos (Graf *et al.*, 2009).

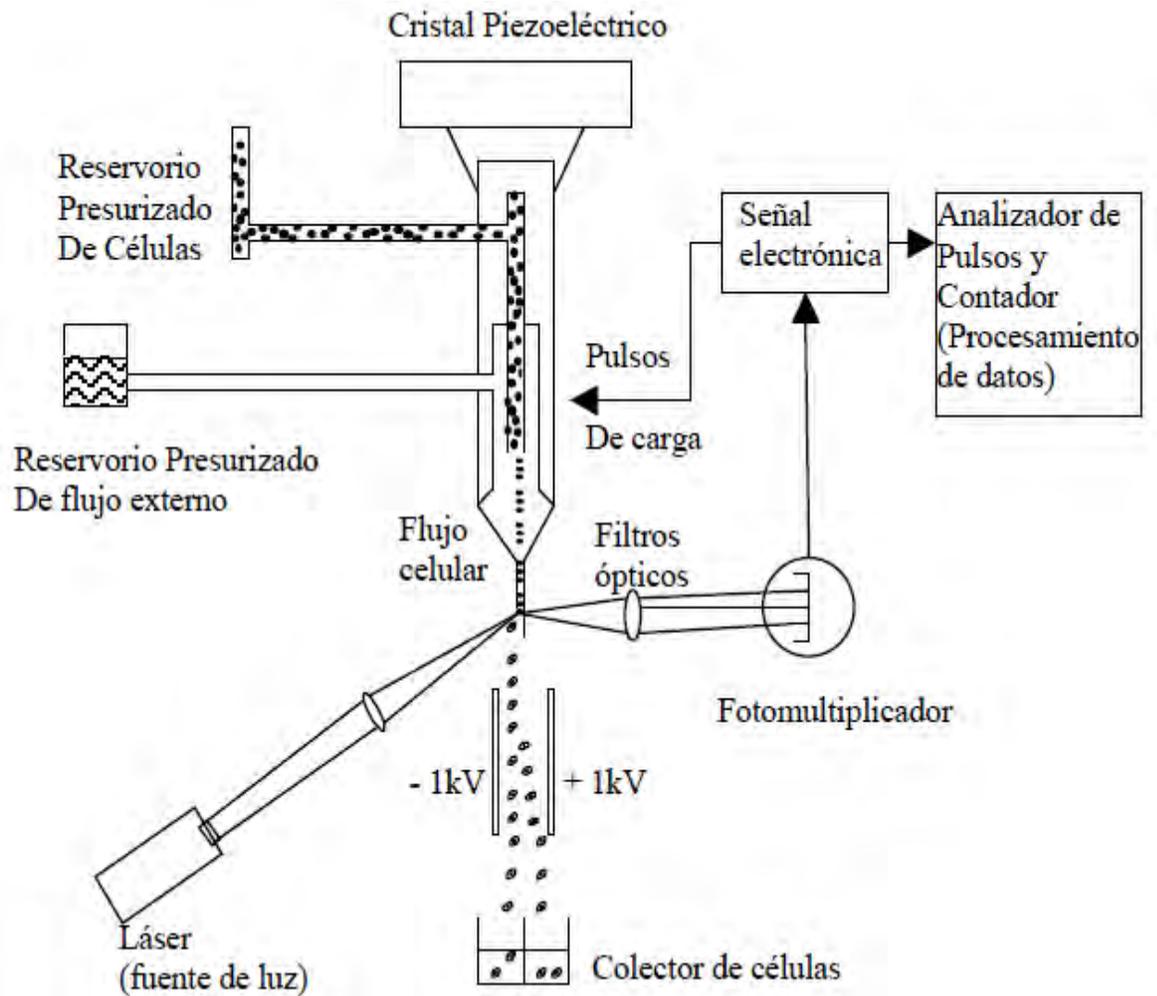
Esta técnica se basa en la diferencia del contenido de ADN de los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el cromosoma Y, que es del 4.2 % en el ovino (Garner *et al.*, 2005).

Las células son teñidas con un fluorocromo (Hoechst 33342), que se une al ADN, y son pasadas a través de un flujo laminar y expuestas a un rayo ultravioleta. Las células con mayor contenido de ADN captan mayor cantidad de fluorocromo y por lo tanto emiten mayor fluorescencia. La fluorescencia emitida es captada por un tubo fotomultiplicador que mediante un sistema computarizado convierte esta intensidad de fluorescencia en información cuantitativa categorizando las células de acuerdo a la intensidad emitida (Figura 5) (Seidel *et al.*, 2003, Rosenfeld *et al.*, 2004)

Se han realizado varios esfuerzos para mejorar esta técnica de sexaje de espermatozoides, logrando obtener entre un 85 y 95 % de enriquecimiento de la población espermática X o Y, pero en la mayoría de los casos con reducción en la fertilidad a nivel de campo (Seidel *et al.*, 2003b; Graf *et al.*, 2009). Además ha reportado el nacimiento de camadas pequeñas en conejos y cerdos, retardo en el desarrollo embrionario y alta mortalidad de embriones (Graf *et al.*, 2009).

La principal causa de la disminución de la fertilidad es el bajo número de espermatozoides vivos que se recuperan del proceso de sexado, debido al estrés físico y químico al cual se someten durante el proceso, como:

- Tinción nuclear con H33342 (Catt *et al.*, 1997; Schenk *et al.*, 1999; Seidel y Garner, 2002).
- Diluciones durante la tinción y pasaje a través del citómetro (Catt *et al.*, 1997; 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).
- El procedimiento de centrifugación y criopreservación (Seidel *et al.*, 2003b, Garner, 2006).



**Fig. 5** Esquema generalizado de los componentes de un citómetro de flujo.

Por otra parte, también la disminución en la viabilidad espermática, se ha relacionado con daños a la membrana, atribuidos posiblemente a que durante el sexaje se inducen cambios ligados a una capacitación y la reacción acrosomal (Hollinshead *et al.*, 2003, Maxwell *et al.*, 1997). Estos cambios afectan la interacción del espermatozoide con las células del oviducto y por consiguiente disminuyen los porcentajes de fertilidad (Hollinshead *et al.*, 2003).

En estudios de funcionalidad *in vitro*, los espermatozoides sexados, muestran una reducción en la viabilidad y funcionalidad de la membrana, cuando se

comparan con espermatozoides no sexados (Graaf *et al.*, 2009). Aunque estudios *in vivo* en vaquillas reportan el 60 al 90 % de fertilidad; en ovejas este porcentaje es del 25 % con semen sexado, significativamente menor al porcentaje de fertilidad con semen no sexado (Hollinshead *et al.*, 2003).

Adicionalmente la principal limitación de la citometría de flujo, es la baja velocidad de separación, normalmente se encuentra entre 3000 a 4000 espermatozoides vivos por minuto, con un 90 % de eficiencia en la separación de las dos poblaciones espermáticas; ya que a mayor velocidad la eficiencia disminuye al 87 %. También debido al procesamiento se pierden aproximadamente un 20 % de espermatozoides, teniendo así una separación de 10 millones de espermatozoides por hora, lo que representa aproximadamente la mitad de una dosis de semen no sexado (Seidel *et al.*, 2003; Valencia *et al.*, 2001).

De cualquier manera el proceso de sexado consume tiempo y el costo es elevado, lo que ha provocado que para la producción de dosis obtenidas por esta técnica no se usen para la inseminación de manera rutinaria en programas de empadre (Beilby *et al.*, 2009). Siendo otro de los inconvenientes, de esta técnica el costo elevado de cada dosis, una limitante más para el uso comercial. Una pajilla de semen sexado, supera el doble de precio de una pajilla de semen no sexado. En los bovinos de leche se menciona que para que el semen sexado pueda tener un beneficio final, el costo no debe duplicar el costo del semen no sexado (Wilson *et al.*, 2006).

### **3.3.2 Centrifugación**

La técnica se fundamenta en la aplicación de una fuerza centrífuga que ayuda a la separación de las partículas suspendidas en un medio líquido. El porcentaje de sedimentación de las partículas, no solo depende de la naturaleza de la partícula, sino también del medio en que se encuentran suspendidas, así como de la fuerza aplicada a las partículas. La sedimentación va en relación al tamaño de la partícula, y otro factor importante que afecta el porcentaje de sedimentación, es la

viscosidad del medio (Rickwood, 1989). Es decir las partículas más grandes sedimentan con mayor rapidez que las pequeñas de forma y densidad similar. Por otra parte la tendencia de las moléculas a sedimentarse durante la centrifugación se contrarresta por efectos de la difusión, que ocasiona que las moléculas se redistribuyan de modo más uniforme (Karp, 2005).

### **3.3.2.1 Tipos de centrifugación**

- **Centrifugación diferencial o empastillado**

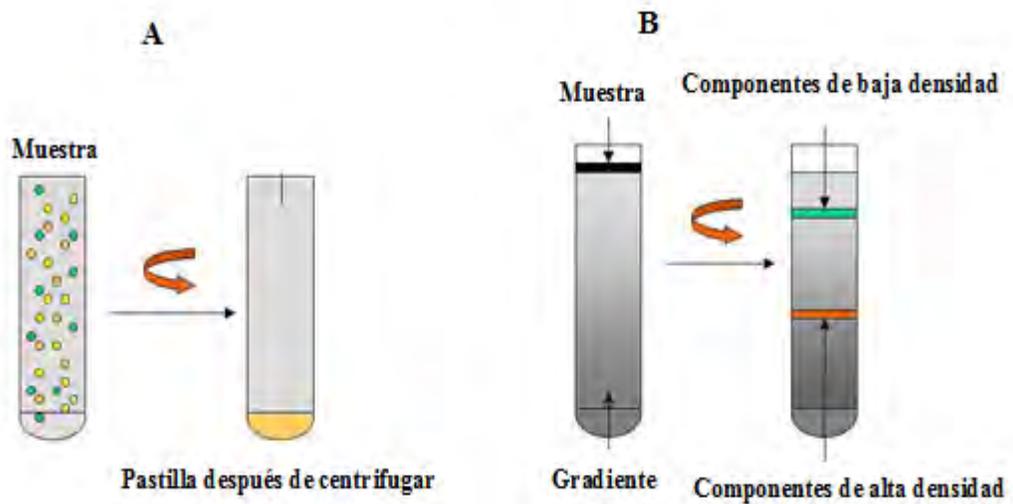
En este método, el tubo de la centrifuga es llenado inicialmente con una mezcla uniforme de la solución de la muestra, a través de la centrifugación se obtiene una separación de dos fracciones: Una pastilla (sedimento) que contiene la partícula sedimentada y un sobrenadante con la fracción no sedimentada de la solución (figura 6).

- **Centrifugación zonal.**

En este método se coloca una pequeña cantidad de la solución con las moléculas que se quieren caracterizar sobre la superficie de un gradiente de densidad previamente formado a lo largo de un tubo de centrifugación. Si todas ellas tienen el mismo coeficiente de sedimentación sedimentarán en una estrecha franja, sin embargo, si hay moléculas con distintos coeficientes de sedimentación, se separaran unas de otras a medida que se produzca la centrifugación y finalmente los diferentes componentes se resolverán en una serie de zonas o bandas, de ahí el nombre de centrifugación zonal (figura 6).

- **Centrifugación Isopícnica**

Las partículas son separadas basadas en su densidad; sólo el tamaño de la partícula o célula afecta su coeficiente de sedimentación. Las partículas se mueven hasta que su densidad es igual a la del medio (Rickwood, 1989).



**Fig 6** Tipos de centrifugación. A) centrifugación diferencial o empastillado se observa la formación de una pastilla en el fondo del tubo después de la centrifugación. B) centrifugación zonal donde se da la formación de dos franjas, ya que las partículas tienen diferente coeficiente de sedimentación.

### 3.3.2.2 Gradientes

Un medio para densidad de gradientes, está formado por dos partes: un soluto y un disolvente. Los gradientes pueden ser continuos, son aquellos en los que la densidad antes de la centrifugación es uniforme en todo el medio y gradientes discontinuos, presentan capas de distintas densidades en el tubo, donde la mayor densidad se encuentra en el fondo (Vázquez, 2008). Los gradientes deben cumplir con ciertas características como:

- Poseer un amplio rango de densidad.
- No afectar la actividad biológica de la muestra.
- No hipo o hiperosmótica.
- Fácil remoción a partir del producto purificado.
- No sea sensible al rango de luz UV y visible.
- Económico y accesible.
- Esterilizable.

- No corrosivo, tóxico e inflamable (Rickwood, 1989).

### 3.3.2.3 Centrifugación en gradientes de densidad

La técnica se fundamenta en el movimiento de las partículas suspendidas en un medio fluido, al aplicarles una fuerza radial, consecuencia de un campo centrifugo. Ello provoca que las partículas más pesadas lleguen al fondo más rápido que aquella de menor peso. Esto sugiere que la separación en gradientes de densidad está en relación con el peso de las mismas (Hassan *et al.*, 2005).

Así la diferencia en el contenido del ADN entre espermatozoides X y Y, causa diferencias en peso y densidad de los mismos, permitiendo su separación en un gradiente continuo o discontinuo (Machado *et al.*, 2009). En 1982 se estimó que la diferencia en el contenido de DNA entre los espermatozoides X y Y de bovino, resulta en una diferencia del espermatozoide Y, de  $7 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$  o 0.06 % de densidad en relación al espermatozoide X, lo que teóricamente es suficiente para separarlos físicamente (Windsor *et al.*, 1993).

Notablemente los procedimientos de centrifugación empleados en los espermatozoides, basados en la diferencia de densidad existente entre los portadores del cromosoma X y Y, y su sexado o separación por medio de gradientes de densidad, han demostrado que se requieren técnicas con alto nivel de resolución (Windsor *et al.*, 1993).

Por ello la separación de espermatozoides, portadores del cromosoma X de los portadores del cromosoma Y mediante gradientes de densidad ha generado interés y a la vez controversia desde los primeros reportes. Ericsson *et al.* (1973) reportó la separación de una fracción rica en espermatozoides Y de humano (85 %), después del paso del semen a través de un gradiente de albúmina sérica bovina. Contrariamente en investigaciones posteriores se aisló una fracción con un 85 % de espermatozoides X con la misma técnica. Sin daños aparente sobre la célula espermática, manteniendo así su capacidad fecundante (Flaterty *et al.*, 1997).

Con el uso del Ficoll- Metrizoato de Sodio, se ha reportado una fracción de hasta 76 % de espermatozoides Y y un 80.6 % de espermatozoides X (Parati K *et al.*, 2006). Hegde (1977) reportó la separación de espermatozoides X y Y de humanos, en un gradiente formado con 8 % de Ficoll y 33 % de metrizoato de sodio y centrifugados a 100 x g durante 20 minutos. La densidad final fue de 1.08 g/ml. Para la validación de la técnica, los espermatozoides de las fracciones obtenidas fueron tratados con quinacrina para poner en evidencia el cuerpo F (Parati K *et al.*, 2006).

Finalmente con el Ficoll-Diatrizoato de Sodio, con una densidad de 1.086, se reportó un enriquecimiento de espermatozoides X (90 %) localizado en el fondo (Vázquez, 2008).

Una de las mayores ventajas de la centrifugación, es que esta técnica permite la disgregación de las células, siendo un método suave que mantiene la función de las células (Alberts 2006). En relación a la célula espermática se ha reportado que los espermatozoides de bovino y equino, son más sensibles a la centrifugación que los espermatozoides de otros mamíferos (Crockett *et al.*, 2001, Carvajl *et al.*, 2004).

Según Jafar y Flint (1996) cualquier método de separación espermática debe cumplir tres premisas fundamentalmente:

- Producir una desviación evidente de la población espermática X o Y,
- No interferir con la capacidad fecundante *in vivo* o *in vitro* de los espermatozoides
- Dar descendencia (embriones o camadas) vivas que confirmen la desviación eficaz de la proporción de espermatozoides X y Y hacia uno u otro lado (Citado por Johnson *et al.*, 2005).

### **3.4 Manipulación del ciclo estral**

El ciclo estral, hace referencia a la presencia de un periodo de receptividad sexual de duración variable, que finaliza con la ovulación (Kilen y Schwartz, 1998). En 1904, Marshall fue el primero en señalar la duración del ciclo estral de la oveja,

describiendo una duración media de 16 a 17 días. Posteriormente, McKenzie y Terrill (1937) señalaron que el 90.4% de los ciclos estrales estudiados presentaban un rango de 14 a 19 días.

En el ciclo estral de la oveja se diferencian dos fases: una fase lútea o progestágena y una fase folicular o estrogénica. La fase lútea posee una duración aproximada de 14 días (Goodman e Inskeep, 2006), y se caracteriza por la presencia de uno o más cuerpos lúteos (CLs) en crecimiento o regresión, que secretan progesterona (P4), observándose que el tamaño de tejido lúteo se correlaciona con las concentraciones de P4 en plasma sanguíneo (Bartlewsky *et al.*, 1999a; González-Bulnes *et al.*, 2000). Los niveles de P4 alcanzan concentraciones máximas entre los días 5 y 13-14 del ciclo, momento en que se inicia la luteolisis (Bartlewsky *et al.*, 1999a; Shanga *et al.*, 2002). La fase folicular o estrogénica se caracteriza por la presencia de uno o más folículos en crecimiento continuo, hasta alcanzar la ovulación, los cuales secretan altos niveles de estradiol-17 $\beta$  (E2-17  $\beta$ ) e inhibina. Asimismo, esta fase consta de un período de receptividad sexual denominado celo, cuya duración puede oscilar entre 10 y 53 horas (Figura 7) (Navarro y Torres, 1985).

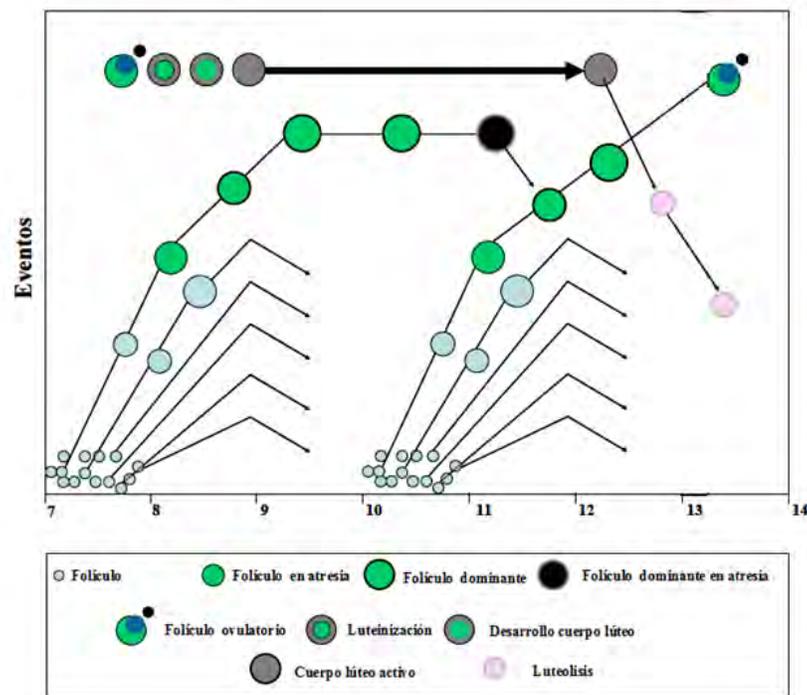
El desarrollo folicular es un proceso que culmina ya sea con la ovulación del folículo maduro o con la regresión del mismo, proceso que se lleva a cabo en onda, observado 3 ondas por ciclo en las ovejas. Se considera que el desarrollo folicular inicia desde la etapa fetal y dos semanas después del nacimiento pueden encontrarse folículos en todas las etapas de desarrollo excepto preovulatorios. Una vez iniciado el crecimiento, los folículos continúan desarrollándose por estímulo de factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ), factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 (IGF-1), inhibina y activina (Galina y Valencia, 2008). Conforme avanza el desarrollo folicular, los folículos se vuelven altamente sensibles a las gonadotropinas y requieren de ellas para continuar su desarrollo; esta fase se divide en reclutamiento y selección y dominancia.

Reclutamiento: durante esta etapa un grupo de folículos se desarrollan por estímulo de la FSH. El tamaño en que el folículo es reclutado y dependiente de

gonadotropinas es de 2 mm de diámetro. Los folículos inician la secreción de estradiol e inhibina, hormonas que suprimen paulatinamente la liberación de FSH.

Selección y dominancia: uno o varios folículos se convierten en dominantes y continúan desarrollándose. El o los folículos dominantes bloquean el soporte hormonal para el resto de aquellos que comenzaron su crecimiento, provocando atresia y reprimiendo el reclutamiento de una nueva oleada. Esto se logra a través de la disminución de FSH inducida por la retroalimentación negativa del estradiol e inhibina que es secretada por el o los folículos.

El folículo logra sobrevivir a la disminución de FSH, gracias a que ha desarrollado receptores para LH en las células de la granulosa. El folículo se mantiene principalmente gracias a la LH, aunque requiere también de FSH en niveles basales y adicionalmente el folículo produce mayores concentraciones de estradiol. (Galina y Valencia, 2008; Hafez y Hafez, 2002)



**Fig 7** Eventos en un ciclo estral de la oveja del día 7 al día 14, donde se observan dos oleadas foliculares (Adaptado por Moraes, 2002).

Los ciclos estrales se repiten de forma continua a lo largo de la vida reproductiva del animal; excepto en los periodos de anestro, ya sean de origen estacional o por la gestación. Los periodos de anestro estacional se relacionan con la característica actividad sexual estacional de la especie ovina, determinada por las variaciones de las horas de luz a lo largo del año (fotoperiodo) ajustada a la latitud en que se encuentren los animales y modulada por la raza (Arroyo *et al.*, 2007). Las ovejas mantenidas en latitudes alejadas de la línea ecuatorial, presentan una mayor actividad sexual durante la época del año en que el número de horas de luz es menor. Este mecanismo garantiza la supervivencia de la especie, haciendo coincidir los nacimientos con la época más favorable del año (primavera), cuando la temperatura ambiental y la abundancia de alimentos permiten maximizar la supervivencia de los corderos (Lindsay *et al.*, 1996). Contrariamente, el efecto de la estacionalidad se ve reducido a medida que nos acercamos a la línea ecuatorial, donde la duración de las horas de luz y de oscuridad llegan a igualarse (Carles y Kipngeno, 1986; Eloy *et al.*, 1990). El ciclo estral en los ovinos se divide en cuatro etapas:

### **3.4.1 Proestro**

Esta fase inicia cuando se da la regresión de cuerpo lúteo del ciclo anterior, provocando así una disminución de la P4 y un incremento en la secreción de E2 e inhibina secretada por los folículos que comenzaron su desarrollo en el diestro. El incremento en la secreción de E2 e inhibina, favorece la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), ya que se da un aumento de sus receptores. A diferencia de otras especies, en la oveja la secreción de FSH es constante y no está regulada por la GnRH, si no por el estradiol y la inhibina folicular. Por ello, durante el proestro las concentraciones de FSH son bajas, contrariamente la LH por efecto del estradiol ha comenzado a incrementar la frecuencia de secreción y a disminuir la amplitud de los pulsos, lo que acentúa la producción de andrógenos por las células de la teca y la capacidad aromática de las células de la granulosa, con el consecuente incremento en la producción de

estradiol (Galina y Valencia, 2008). Los E2 inducen un aumento de sus propios receptores, así como los receptores de FSH, provocando una sensibilización de las células de la granulosa a estas dos hormonas, produciendo un crecimiento folicular y un nuevo impulso para la producción de E2 e inhibina (León, 2009).

El incremento en la producción de estrógenos foliculares, prepara el aparato reproductor de la hembra, para su apareamiento. El útero se aprecia agrandado y edematoso, y las glándulas endometriales aumenten de tamaño, por lo que se dice que entran en una fase proliferativa. La duración del proestro en la oveja es de 2-3 días, el final coincide con el inicio de la receptividad sexual (Galina y Valencia 2008; León, 2009).

### **3.4.2 Estro**

Es la etapa de receptividad sexual o calor donde la hembra busca activamente al macho, acepta la monta y el apareamiento (Galina y Valencia, 2008). La duración del estro en la mayoría de las ovejas varía entre 24 y 36 horas, aunque en algunas hembras puede durar hasta 48 horas. Variación que se puede ver influenciada por factores como la edad, raza, contacto con el macho y altitud (León, 2009).

En esta etapa los folículos en desarrollo alcanzan su madurez y tamaño preovulatorio, llegando a las máximas concentraciones de estrógenos, provocando un aumento en la frecuencia de los pulsos de GnRH y LH, ocasionando así oleadas preovulatorias de LH, que llevan a cambios en la pared del folículo y ruptura de su pared, que culmina con la ovulación (Clarke, 1982).

Los estrógenos son los responsables de provocar la conducta sexual, en el caso de la oveja el cerebro requiere una exposición previa a progesterona para sensibilizarlo a la acción del estradiol. Es por ello que la ovulación del primer ciclo estral de la pubertad o estación reproductiva no se acompaña de signos de estro (Galina y Valencia, 2008).

### **3.4.3 Metaestro**

El metaestro inicia cuando la receptividad sexual termina y concluye en el momento en que existe el cuerpo lúteo bien establecido, y dura 3 días en promedio. Corresponde al periodo de transición entre la predominancia estrogénica y el incremento en la concentración de progesterona. Existe un incremento de LH en la célula de la granulosa, permitiendo el inicio del proceso de luteinización folicular, y una disminución de estradiol e inhibina (Evans *et al.*, 1990; Galina y Valencia, 2008).

### **3.4.4 Diestro**

Es la fase del ciclo estral que tiene mayor duración, entre 9 -12 días, caracterizada por la plena funcionalidad del cuerpo lúteo y termina con la destrucción del mismo (Evans *et al.*, 1990). Al formarse el cuerpo lúteo, la progesterona alcanza sus máximas concentraciones, por lo que ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de LH, debido a que se inhibe la formación de receptores a GnRH (León, 2009).

La progesterona estimula la actividad secretora del endometrio con la finalidad de albergar una posible gestación, adicionalmente el cérvix se cierra y se reduce la secreción de moco cervical y vaginal. También es posible detectar la liberación endometrial del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), que favorece la capacidad mitogénica de endometrio y estimula el desarrollo del blastocito (Galina y Valencia, 2008).

### **3.4.5 Sincronización de estro**

La sincronización de estro se lleva a cabo cuando las ovejas, están ciclando. Con el fin de controlar el ciclo estral de un grupo de hembras, independientemente de la etapa en que se encuentren individualmente y con la finalidad de que se presente receptividad sexual en forma simultánea (Verdiguél, 2009). El protocolo de sincronización, debe inducir una atresia de todos los folículos grandes en cualquier etapa de desarrollo, lo que resulta en un

reclutamiento de una nueva oleada folicular y el desarrollo de un folículo dominante (Álvarez, 2005).

El control del ciclo sexual, concretamente la inducción y sincronización del estro, se ha llevado a cabo en ovejas mediante el empleo tanto de métodos farmacológicos como naturales. Dentro de los farmacológicos, los productos más utilizados incluyen progestágenos o progesterona natural en diferentes formas; como implantes, esponjas vaginales o dispositivos de liberación controlada (Menegotas., 2003). Tratamientos con esponjas vaginales impregnadas con progesterona, acetato de medroxiprogesterona (MAP) o acetato de fluorogestona (FGA) o implantes con norgestomet, son utilizados en ovejas (Boscos, 2002). El método de esponja intravaginal impregnada de progestágeno ha sido utilizado con buenos resultados, la esponja se coloca en la vagina por un periodo de 9 a 14 días, similar al número de días que dura el diestro. La administración de FGA simula la presencia de un cuerpo lúteo, mediante la liberación lenta de progesterona y por retroalimentación negativa, provoca que se suprima la secreción de GnRH a nivel del hipotálamo y por consiguiente una disminución en la secreción de la gonadotropinas, limitando el desarrollo folicular (León, 2009). Al retirar la esponja se suprime la administración de progestágeno, suprime la retroalimentación negativa de GnRH y la hipófisis libera gonadotropinas, se estimula el crecimiento folicular por acción de FSH y ocurre la ovulación por acción de la LH en un lapso de 24 a 36 horas después de retirar el tratamiento (Scudamore, 1993).

También se han utilizado prostaglandina F<sub>2</sub>α (PgF<sub>2</sub>α), sustancia que naturalmente se producen en una gran variedad de tejidos e influyen sobre un amplio número de funciones en el organismo. Se cree que la PgF<sub>2</sub>α, tiene un efecto vasoconstrictor por el cual produce la luteólisis, dando origen a un nuevo ciclo estral. Sin embargo, sólo los cuerpos lúteos con cuatro o cinco días de vida al momento de la aplicación de PgF<sub>2</sub>α, son sensibles a su efecto luteolítico. Por lo tanto, no puede usarse antes del día cuatro del ciclo (Álvarez, 2005).

### **3.4.6 Inseminación artificial**

La IA, se puede definir como un método reproductivo en el que los gametos masculinos o espermatozoides, son depositados dentro del aparato reproductor de la hembra, por medios distintos al de la cópula natural. Esta técnica se lleva a cabo hace más de 50 años a nivel mundial y en México se inicia de forma comercial con buenos resultados en los años 70 (Mejía, 2005). Dependiendo del sitio en donde se deposite el semen, puede considerarse que la inseminación artificial se realiza vaginalmente, cervicalmente o intrauterinamente.

En la inseminación vaginal, sólo se recomienda la utilización de semen fresco diluido. Consiste simplemente en depositar el semen lo más profundo de la vagina sin intentar encontrar el cérvix. Los resultados en la mayoría de las ocasiones son bajos porcentajes de gestaciones y prolificidad (Salamon, 1990; Mejía, 2010).

La inseminación cervical es la técnica más sencilla y que llega a ser muy efectiva para el uso de semen fresco o enfriado. Consiste en la introducción de un vaginoscopio hasta localizar el cérvix y se deposita el semen en la entrada del mismo. Para alcanzar porcentajes de fertilidad entre el 70 y 80 %, es conveniente la doble inseminación cervical, particularmente en ovejas sincronizadas con progestágenos y eCG (Mejía, 2010). De manera práctica, la inseminación cervical se realiza después de la detección de celo ya sea con machos vasectomizados, con el pene desviado o cubiertos con un mandil de tela suave. Las hembras que permanecen quietas cuando el macho trata de montarlas, deben inseminarse por primera vez alrededor de las 10-12 horas después de haber sido detectado el celo y la segunda inseminación 12 horas posteriores a la primera (Salamon, 1990).

La inseminación intrauterina por laparoscopia tiene mayor ventaja, ya que el semen es depositado directamente dentro del lumen uterino, evitando la barrera natural del cérvix y mejora de forma considerable la fertilidad (León, 2009). Los porcentajes de fertilidad en la ovejas inseminadas intrauterinamente con semen congelado, oscila entre 30 y 60 %, mientras que con semen fresco no menor a 60

% (Mejía, 2005). En el caso del uso de semen congelado la inseminación se realiza alrededor de las 24 horas de detectarse el estro o sin detección del estro alrededor de las 60 horas posteriores al retiro del progestágeno y de la administración de eCG ( Meghan *et al.*, 2004; Mejía, 2010).

Como cualquier tipo de tecnología, la inseminación presenta ventajas tales como:

- Mejora genética, con la utilización de sementales superiores se puede tener un beneficio directo sobre la producción de la progenie. También facilita la introducción o cambio a otro genotipo.
- Fácil transporte del material genético, gracias al manejo de semen diluido en fresco, enfriado o congelado es más fácil y económico el transporte del semen, que de los sementales.
- Conservación prolongada del semen, ya que el semen de sementales valiosos se puede congelar para ser utilizado, a corto o largo plazo.
- Aumento de la eficiencia reproductiva, mejor y mayor utilización del material genético, ya que a partir de un eyaculado es común obtener entre 30 – 40 dosis de semen fresco. Reduciendo así el numero de macho en la explotación.
- Prevención de enfermedades, ya que por medio de la IA, se evita el contacto directo entre el macho y la hembra, por lo que existe un mejor control y prevención de diferentes enfermedades, principalmente las de transmisión sexual (Salamon *et al.*, 1990; Mejia, 2005,).

También presenta desventajas como: un costo relativamente elevado y la fertilidad obtenida por la IA, es menor si se compara con la monta natural (Mejia, 2005)

#### **IV.- JUSTIFICACIÓN**

Investigaciones recientes, empleado semen de bovino, señalan que la separación de espermatozoides por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Diatrizoato de Sodio, permite tener el enriquecimiento de la población espermática con cromosoma X; siendo este un método rápido además de económico. Actualmente, la citometría de flujo es la única técnica que ha demostrado ser efectiva para la separación de espermatozoides X y Y, sin embargo durante el proceso se causan múltiples daños a la célula y tiene un costo elevado.

## **V.- OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la eficiencia y capacidad fecundante *in vivo* de espermatozoides de ovino sexados por densidad de gradientes con Ficoll-Diatrizoato de Sodio.

## **VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Enriquecer las poblaciones espermáticas con el cromosoma X mediante la técnica de centrifugación en gradientes de Ficoll-Diatrizoato de Sodio.
- Evaluar la integridad de los espermatozoides antes y después del sexado por centrifugación en gradientes de Ficoll-Diatrizoato de Sodio.
- Determinar el porcentaje de fertilidad después de la inseminación con semen sexado por centrifugación en gradientes de Ficoll-Diatrizoato de Sodio.
- Determinar el sexo de las crías, después de la inseminación con semen sexado por centrifugación en gradientes de Ficoll-Diatrizoato de Sodio.

## **VII.- HIPOTESIS.**

La centrifugación de semen ovino en gradientes de densidad con Ficoll-Diatrizoato de Sodio permitirá la separación de una población enriquecida con espermatozoides con cromosoma X, manteniendo su capacidad fecundante.

## **VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Localización**

El trabajo de campo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ubicado en el Km 53.1 de la carretera federal México-Cuernavaca, en el poblado de Tres Marías, municipio de Huitzilac en el Estado de Morelos. La altitud es de 2,743 msnm y el clima de la región es, Cb (m) (w) ig; templado semi-frío con verano fresco y largo. Las lluvias se presentan en los meses de mayo a octubre, con precipitación promedio de 1,724.6 mm y la temperatura media anual de 9.9 °C.

### **Animales**

Se utilizaron 60 ovejas hembras y 2 machos de raza Suffolk, en un sistema semi-intensivo de producción, con pastoreo diurno en praderas compuestas de pasto Rye grass perenne, Orchard y trébol blanco. Por la tarde son alojadas en corrales, donde se suplementan con heno de avena y concentrado comercial, proporcionando 3.05 MCal de energía metabolizable y 14.7 % de proteína cruda por kilogramo de materia seca.

### **Sincronización de estros**

Para la sincronización del estro se utilizaron esponjas vaginales impregnadas con 20 mg de acetato de fluorogestona (Chronogest de Laboratorio Intervet), que permanecieron 9 días y al retirarlas se aplicaron 200 UI de eCG por vía intramuscular (Folligon de Laboratorio Intervet) (figura 8).



**Fig. 8** Ovejas en los cuales se puede apreciar la permanencia de las esponjas vaginales.

### **Obtención de semen**

Los eyaculados fueron recolectados mediante vagina artificial de dos machos de raza Suffolk, de 2 años de edad, con un peso de 125 kg, identificados como macho A y B, ambos con fertilidad probada.

Se obtuvieron 5 eyaculados de cada macho, los cuales fueron identificados con un número consecutivo y la letra A o B, dependiendo del macho. Los eyaculados fueron diluidos en TRIS (Tris 300 mM, fructosa 27.8 mM, ácido cítrico 94.7 mM) (Hollinshead *et al.*, 2003) a 35 °C, en una proporción 1:1, para ser transportados al laboratorio de Morfología de la FMVZ-UNAM, protegido de la luz, en una camisa de agua a 35 °C.

Al llegar al laboratorio se determinó la temperatura a la que se encontraba el eyaculado y se realizó la evaluación de la viabilidad espermática de cada eyaculado incluyendo: motilidad en masa, motilidad progresiva, evaluación de la integridad de la membrana (Tinción Eosina-Nigrosina), estado de capacitación (Tinción Clortetraciclina) y del acrosoma (Tinción de Coomassie).

### **Motilidad en masa**

Se colocó una gota semen sobre un portaobjeto limpio y seco a 37 °C, se observó con un microscopio, a un aumento de 100X. La estimación de la motilidad se basó en el vigor de las ondas espermáticas, para dar un valor entre 0 y 5. Los eyaculados frescos con una valoración menor a 3 fueron desechados (tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de la motilidad en masa espermática de ovino. Adaptado por Evans y Maxwell, 1990.

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas y remolinos de movimiento muy rápidos
4	Buena	Movimientos vigorosos, pero las ondas y remolinos no son rápidos
3	Regular	Ondas de movimiento lento
2	Pobre	No se aprecian ondas, pero sí movimiento de la muestra
1	Muy pobre	Muy poco movimiento
0	Muertos	Ningún movimiento

### **Motilidad progresiva**

Se utilizó una gota de semen diluida en una gota de solución salina fisiológica sobre un portaobjeto limpio, seco a 37 °C, se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio, a un aumento de 100X, se observaron varios campos y se valoró el porcentaje de espermatozoides motiles entre 0 y 100 %. Los eyaculados con una motilidad menor al 80 % fueron descartados.

### Evaluación de la integridad de la membrana

Se utilizó la tinción de Eosina-Nigrosina (EN) para evaluar el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta. La muestra de semen fue diluido 1:8 con la tinción de EN (eosina 0.167, nigrosina 1 gr, citrato de sodio 0.29 gr, agua destilada cbp 10 ml) e incubado a 37 °C durante 5 minutos, posteriormente se realizó un frotis, el cual se dejó secar al aire libre y una vez seco se aplicó resina y se cubrió con el portaobjeto. Posteriormente, se realizó la evaluación en el microscopio a un aumento de 100X, observando 100 espermatozoides por muestra, diferenciando aquellas que tuvieran la membrana plasmática alterada por permitir que el colorante penetrara al interior de los mismos, dando una coloración púrpura total o parcial, mientras que aquellos espermatozoides con membrana intacta no permitieron la penetración del colorante y por lo tanto, no presentaban coloración (Figura 9) (Bamba 1988).



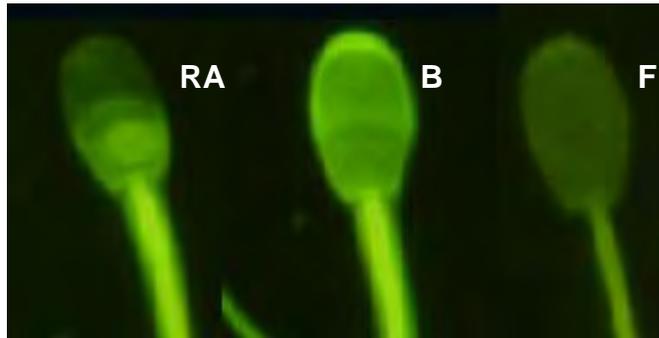
**Fig 9.** Espermatozoides de ovino teñidos con Eosina-Nigrosina, **M-**espermatozoide muerto, **V-**espermatozoide vivo

### Evaluación del estado de capacitación

El estado de capacitación espermática, se evaluó por medio de la tinción de Clortetraciclina (CTC). Para lo cual se lavó la muestra cuantas veces fuera necesario, hasta que el sobrenadante tuviera una apariencia cristalina, posteriormente la muestra se re suspendió en PBS, ajustando a una concentración de  $100 \times 10^6$  de espermatozoides por ml. Se agregó 45  $\mu$ l de solución de CTC (NaCl 130 mM, Tris-HCl 20 mM, L-Cisteina 5 mM, CTC 750  $\mu$ M, pH 7.8) a 45  $\mu$ l de muestra, se mezcló durante 30 segundos en obscuridad. Se fijó la muestra con 10  $\mu$ l de glutaraldehído al 1 % (en Tris-HCl 0.5 M pH 7.4). Se monto la muestra en un portaobjeto previamente desengrasado, colocando 4  $\mu$ l de la muestra cubriéndola con una gota de solución de montaje (glicerol:PBS 9:1). Las laminillas se almacenaron en obscuridad y en refrigeración hasta su evaluación. La evaluación se realizó en un microscopio de fluorescencia (Leica 020-518.500 DM/LS) utilizando el filtro azul excitación 405-455 nm (Gillan *et al.*, 1997).

**Tabla 3.** Patrones de tinción para CTC de espermatozoides de ovino. Adaptado por Gillan *et al.*, 1997)

<b>Patrón</b>	<b>Descripción</b>
<b>Patrón F</b>	Fluorescencia uniforme en toda la cabeza o con un incremento de la fluorescencia en la zona acrosomal, característico de espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto.
<b>Patrón B</b>	Fluorescencia en la región acrosomal, característico de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto.
<b>Patrón RA</b>	Banda fluorescente en el segmento ecuatorial o fluorescencia en la región posacrosomal, característico de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal.



**Fig. 10** Tinción de Clortetraciclina de espermatozoides de ovino, en la cual se observan los diferentes patrones. RA y B espermatozoides capacitados, F espermatozoide no capacitado.

#### **Prueba Hiposmótica-azul de Coomassie**

Para evaluar la integridad del acrosoma y la funcionalidad de membrana plasmática se realizó la prueba Hiposmotica-azul de Coomassie. Para la cual se ajustó la concentración espermática a  $35 \times 10^6$  espermatozoides/ml, la prueba constó de dos frotis uno testigo y otro prueba.

Frotis testigo: se tomaron 100  $\mu$ l de semen y se le agregaron 100  $\mu$ l de paraformaldehído al 4 %, se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se lavó en dos ocasiones con PBS a 2500 rpm durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se reconstituyó con 100  $\mu$ l de cloruro de amonio (50 mM PBS), para realizar un frotis en un portaobjeto desengrasado y se dejó secar al aire.

Frotis prueba: se tomaron 100  $\mu$ l de semen y se le agregaron 100  $\mu$ l de solución Hiposmotica(fructosa 0.5 ml al 2.7 %, citrato de sodio 0.5 ml al 1.46 %) se incubó a 37 °C durante 60 minutos, posteriormente se le agregaron 200  $\mu$ l de paraformaldehído al 4 %; se dejó 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó la muestra en dos ocasiones con PBS a 2500 rpm durante 3 minutos; se reconstituyó la pastilla de espermatozoides con 100  $\mu$ l de cloruro de amonio se realizó el frotis en un portaobjeto desengrasado y se dejó secar al aire.

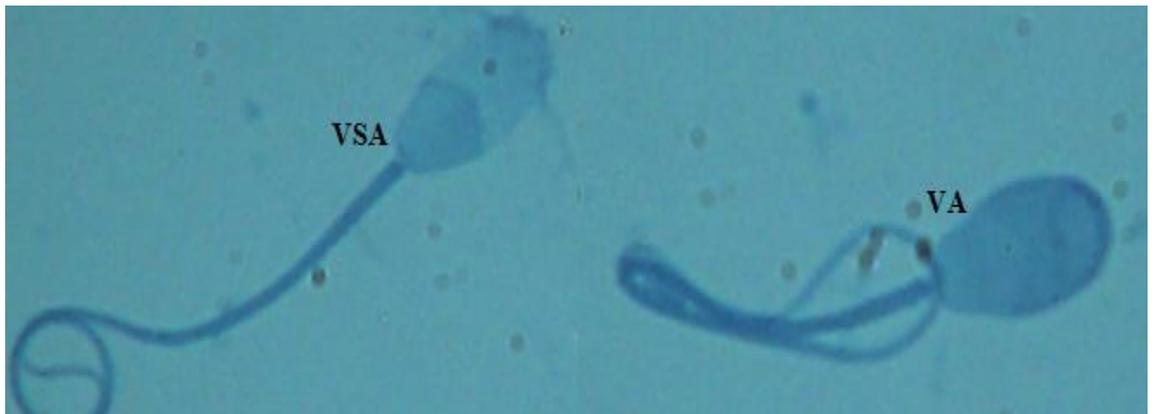
Los frotis ya secos, se sumergieron en azul de Coomassie (azul Coomassie 0.55 gr, metanol 12.5 ml, ácido acético 2.5 ml, agua destilada cbp 125 ml) por 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con agua destilada para remover el exceso de colorante, se dejaron secar y posteriormente se cubrieron con resina y un portaobjetos. Las laminillas fueron evaluadas en el microscopio a un aumento de 100X, se evaluaron 200 células por muestra.

#### Resultados

- Cola enrollada - espermatozoide vivo
- Cola recta – espermatozoide muerto
- Porción acrosomal teñida de azul – espermatozoide con acrosoma
- Porción acrosomal sin teñir – espermatozoide sin acrosoma (Figura 11)

(Rodriguez *et al.*, 1997, Larson y Miller 1999).

•



**Fig. 11** Prueba Hiposmotica-azul de Coomassie. **VSA**- espermatozoide vivo de ovino sin acrosoma, **VA**-espermatozoide vivo de ovino con acrosoma intacto.

#### Sexado de semen

Para este proceso los eyaculados fueron lavados en PBS, a 2500 rpm durante 5 minutos para retirar el plasma seminal y el medio de transporte, se retiró el sobrenadante y la pastilla espermática se resuspendió en PBS. La muestra se dividió en dos fracciones, una para ser utilizada como control (semen no sexado) y otra para ser sexada por centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-Diatrizoato de sodio. Para esto último el semen se ajustó a una

concentración de  $160 \times 10^6$  espermatozoides/ml en PBS. Se colocó 1 ml de muestra sobre un colchón compuesto de 2.4 ml de Ficoll (SIGMA Cat F4375-100G) al 8 % en PBS mezclado con 1 ml de Diatrizoato de sodio (SIGMA S4506-100G ) al 32.8 % en PBS, en tubos de ensaye de vidrio de 10 ml. Se centrifugó a 700 rpm durante 20 minutos. Después de la centrifugación se formaron 3 bandas intermedia separadas por 2 interfases, quedando al fondo una pastilla rica en espermatozoides con cromosoma X. Se recuperó la pastilla, la cual contenía una concentración promedio de  $40 \times 10^6$ , se lava con PBS a 2500 y posteriormente se resuspendió en diluyente comercial. Se realizo nuevamente la evaluación, envasado y posteriormente la inseminación.

### **Inseminación intrauterina**

La inseminación a las ovejas se realizo 48 horas después de retirar las esponjas, para esto se formaron dos grupos de 30 ovejas, el primer grupo (control) se insemino con semen no sexado y el otro con semen sexado con cromosoma X. Previamente las ovejas fueron dietadas de agua y alimento por 24 horas, para la inseminación las ovejas fueron tranquilizadas con hidrocloreuro de xilacina (0.1 mg/Kg), vía intramuscular y como anestésico se utilizo ketamina vía endovenosa a una dosis de 1 mg/kg. En seguida se realizó el rasurado y lavado antiséptico de la región abdominal caudal. Las hembras fueron colocadas en la camilla de inseminación, en posición decúbito dorsal, elevándose los miembros pélvicos en ángulo de  $45^\circ$ , con la finalidad de desplazar de las vísceras hacia la parte craneal del abdomen. Se realizaron dos pequeñas incisiones, a 4 cm anteriores a la ubre y a cada lado de la línea media, por una de ellas introdujo un ajuga de Veress, con la cual se insufló la cavidad abdominal, una vez insuflada la cavidad y retirada la ajuga de Veress, se introdujo por el lado izquierdo un trocar con cánula de 5 mm de diámetro y a través de esta se insertó un laparoscopio recto de 5 mm, mientras que por la incisión derecha se coloco un segundo trocar con cánula de 5 mm y a través de esta un bastón para acomodar el útero, ya posicionado el útero, se retiró el bastón y se introdujo la pistola de

inseminación con la pajilla y la funda de Aspic, para depositar el semen. Se inseminó una dosis de  $20 \times 10^6$  de espermatozoides en cada cuerno uterino, para ambos grupos (control y sexado). Finalizada la inseminación, las incisiones fueron suturadas con nylon de 1-0.

### **Análisis estadístico**

Para la evaluación de la viabilidad espermática antes y después del sexado se utilizó la prueba T de Student para muestras pareadas, empleando el programa estadístico SPSS. Para la evaluación de la proporción de ovejas gestantes y del sexo de las crías entre el grupo inseminado con semen sexado y no sexado se utilizó Chi cuadrada.

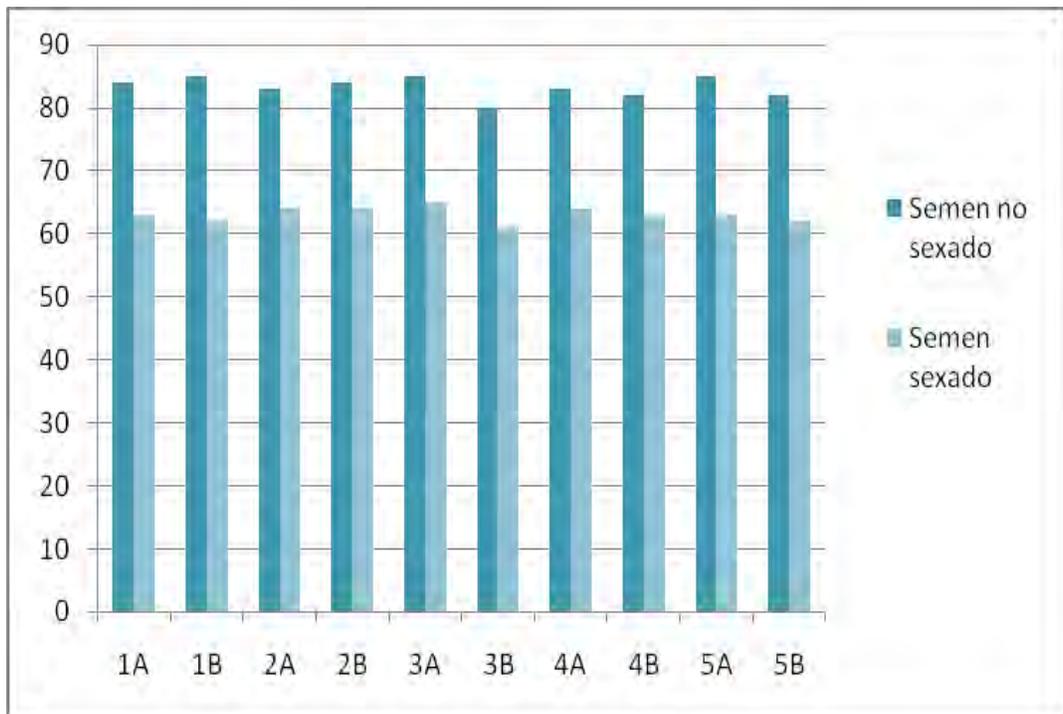
## IX.- RESULTADOS

En la tabla 4 y grafica 1, se muestra el porcentaje de espermatozoides vivos, evaluados por la tinción de Eosina-Nigrosina, del semen no sexado y del sexado, mostrando una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre ambas muestras. El promedio de espermatozoides vivos en el semen no sexado (83.3 %) se redujo aproximadamente 20 %, después del proceso de sexado.

**Tabla 4.** Porcentaje individual y promedio de espermatozoides vivos y muertos, en los eyaculados de borrego no sexado y sexado por gradientes de densidad Ficoll-Diatrizoato, con la tinción Eosina-Nigrosina.

Identificación del eyaculado	Espermatozoides no sexados		Espermatozoides sexados	
	% vivos	% muertos	% vivos	% muertos
eyaculado 1 A	84 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	63 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>
eyaculado 1 B	85 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	62 <sup>b</sup>	38 <sup>b</sup>
eyaculado 2 A	83 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	64 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>
eyaculado 2 B	84 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	64 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>
eyaculado 3 A	85 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	65 <sup>b</sup>	35 <sup>b</sup>
eyaculado 3 B	80 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	61 <sup>b</sup>	39 <sup>b</sup>
eyaculado 4 A	83 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	64 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>
eyaculado 4 B	82 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	63 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>
eyaculado 5 A	85 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	63 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>
eyaculado 5B	82 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	62 <sup>b</sup>	38 <sup>b</sup>
<b>Promedio</b>	<b>83.3<sup>a</sup></b>	<b>16.7<sup>a</sup></b>	<b>63.1<sup>b</sup></b>	<b>36.9<sup>b</sup></b>

a y b muestran una diferencia estadística significativa entre porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, antes y después del sexado



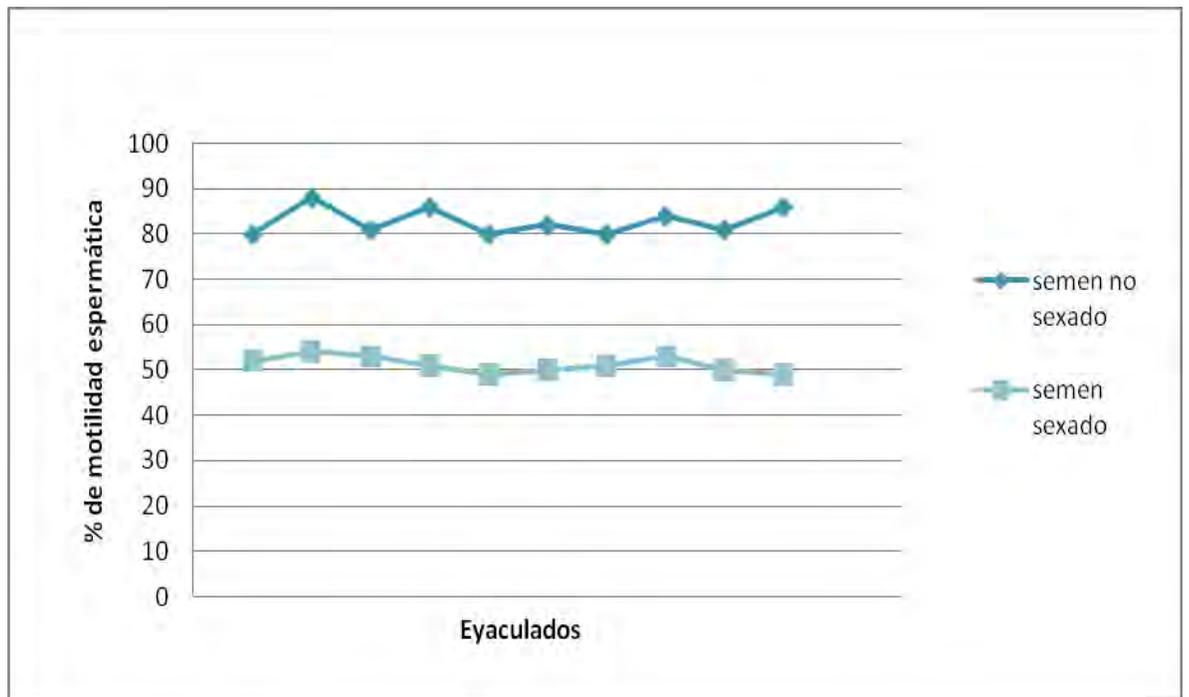
**Grafica 1** Porcentajes de espermatozoides de ovino vivos y muertos evaluados con EN, antes y después del sexado.

En la tabla 5 y grafica 2, se muestra la motilidad espermática progresiva, de semen no sexado y sexado, habiendo una diferencias estadística significativa ( $P < 0.05$ ). En el caso de semen sexado, la motilidad se evaluó después de resuspenderlo en el diluyente comercial.

**Tabla 5.** Evaluación individual y promedio de la motilidad progresiva de los eyaculados de borrego no sexado y sexado por gradientes de densidad Ficoll-Diatrizoato.

Identificación del eyaculado	Semen no sexados	Semen sexados
	motilidad progresiva	motilidad progresiva
eyaculado 1 A	80 <sup>a</sup>	52 <sup>b</sup>
eyaculado 1B	88 <sup>a</sup>	54 <sup>b</sup>
eyaculado 2 A	81 <sup>a</sup>	53 <sup>b</sup>
eyaculado 2B	86 <sup>a</sup>	51 <sup>b</sup>
eyaculado 3 A	80 <sup>a</sup>	49 <sup>b</sup>
eyaculado 3B	82 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>
eyaculado 4 A	80 <sup>a</sup>	51 <sup>b</sup>
eyaculado 4B	84 <sup>a</sup>	53 <sup>b</sup>
eyaculado 5 A	81 <sup>a</sup>	50 <sup>b</sup>
eyaculado 5B	86 <sup>a</sup>	49 <sup>b</sup>
<b>Promedio</b>	<b>82.8<sup>a</sup></b>	<b>51.2<sup>b</sup></b>

a y b muestran una diferencia estadística significativa entre la motilidad espermática progresiva, antes y después del sexado.



**Grafica 2** Evaluación individual y promedio de la motilidad progresiva. En esta grafica se observa como decrece la motilidad espermática después del sexado.

En el tabla 6 se muestra los resultados de la evaluación de la prueba Hiposmótica-azul de Coomassie, encontrándose una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Entre muestras se observa que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma en semen no sexado (77.6 %), se reduce después del sexado a 57.2 %.

**Tabla 6.** Evaluación individual y promedio de la funcionalidad de la membrana espermática y el estado del acrosoma de los espermatozoides de ovino no sexados y sexados en gradientes de densidad Ficoll-Diatrizoato (Prueba Hiposmótica-azul de Coomassie).

Identificación del eyaculado	Semen no sexado				Semen Sexado			
	Vivos C/A	Vivos S/A	Muertos C/A	Muertos S/A	Vivos C/A	Vivos S/A	Muertos C/A	Muertos S/A
eyaculado 1 A	78 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	57 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>	32 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>
eyaculado 1B	78 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	57 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	29 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>
eyaculado 2 A	76 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	56 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>	28 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>
eyaculado 2B	79 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	58 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>	27 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>
eyaculado 3 A	80 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	59 <sup>b</sup>	6 <sup>a</sup>	28 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>
eyaculado 3B	76 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	55 <sup>b</sup>	6 <sup>a</sup>	32 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>
eyaculado 4 A	79 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	58 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	29 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>
eyaculado 4B	76 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	54 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>	29 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>
eyaculado 5B	77 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>	27 <sup>b</sup>	6 <sup>a</sup>
eyaculado 5 A	77 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	58 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>	24 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>
<b>Promedio</b>	<b>77.6<sup>a</sup></b>	<b>7.7<sup>a</sup></b>	<b>8.7<sup>a</sup></b>	<b>6<sup>a</sup></b>	<b>57.2<sup>b</sup></b>	<b>6.4<sup>a</sup></b>	<b>28.5<sup>b</sup></b>	<b>7.9<sup>a</sup></b>

a y b muestran una diferencia estadística significativa, en los porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides muertos con acrosoma intacto, antes y después del sexado. C/A con acrosoma intacto, S/A sin acrosoma.

En la tabla 7 se observa que también existió en el estado de capacitación entre los espermatozoides sexados y no sexados, una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). En el caso de los espermatozoides no sexados el porcentaje fue de 61.8 % de espermatozoides no capacitados, mientras que después del sexado fue de 39.6, estos porcentajes teóricamente representa el número de espermatozoides que tienen la capacidad de fertilizar.

**Tabla 7.** Evaluación del estado fisiológico individual y promedio de los eyaculados de borrego no sexado y sexados (Tinción de CTC).

	Semen no sexado		Semen Sexado	
	no capacitado	capacitado	no capacitado	capacitado
eyaculado 1 A	65 <sup>a</sup>	35 <sup>b</sup>	40 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>
eyaculado 1 B	59 <sup>a</sup>	41 <sup>b</sup>	39 <sup>a</sup>	61 <sup>b</sup>
eyaculado 2 A	60 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	41 <sup>a</sup>	59 <sup>b</sup>
eyaculado 2 B	59 <sup>a</sup>	41 <sup>b</sup>	37 <sup>a</sup>	63 <sup>b</sup>
eyaculado 3 A	63 <sup>a</sup>	37 <sup>b</sup>	39 <sup>a</sup>	61 <sup>b</sup>
eyaculado 3 B	62 <sup>a</sup>	38 <sup>b</sup>	42 <sup>a</sup>	58 <sup>b</sup>
eyaculado 4 A	65 <sup>a</sup>	35 <sup>b</sup>	41 <sup>a</sup>	59 <sup>b</sup>
eyaculado 4 B	60 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>	39 <sup>a</sup>	61 <sup>b</sup>
eyaculado 5 A	64 <sup>a</sup>	36 <sup>b</sup>	40 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>
eyaculado 5 B	61 <sup>a</sup>	39 <sup>b</sup>	38 <sup>a</sup>	62 <sup>b</sup>
<b>Promedio</b>	<b>61.8<sup>a</sup></b>	<b>38.2<sup>a</sup></b>	<b>39.6<sup>b</sup></b>	<b>60.4<sup>b</sup></b>

a y b muestran una diferencia estadística significativa en los porcentajes de espermatozoides capacitados antes y después del sexado.

En la tabla 8 se muestra los porcentajes de gestación de hembras inseminadas con semen sexado y no sexado. Observándose diferencia entre grupos (semen no sexado y sexado) ( $P < 0.05$ ). El diagnóstico de gestación se realizó con ultrasonido a los 45 días post-inseminación.

**Tabla 8.** Porcentajes de gestación en hembras inseminadas con semen sexado y no sexado.

Tipo de Semen	Numero ovejas inseminadas	Numero ovejas gestantes	% de Gestación
<b>No Sexado</b>	30	20	66.66 <sup>a</sup>
<b>Sexado</b>	30	7	23.3 <sup>b</sup>

a y b muestran una diferencia estadística significativa, en los porcentajes de gestación entre el grupo de ovejas inseminadas con semen sexado y no sexado.

En la tabla 9 se muestra la prolificidad de las ovejas del grupo inseminado con semen no sexado y sexado, no habiendo una diferencias significativa ( $P>0.05$ ), también se muestra el sexo de la crías de ambos grupos, donde no se encontró diferencia significativa ( $P>0.05$ ), entre los porcentajes crías hembras y machos.

**Tabla 9.** Porcentaje de prolificidad de las ovejas, numero y sexo de la crías, en los grupos inseminados con semen no sexado y sexado.

Tipo semen	Numero crías	Prolificidad	Machos	Hembras
<b>No sexado</b>	24	120 % <sup>a</sup>	13 (54.1 %) <sup>a</sup>	11(45.8 %) <sup>a</sup>
<b>Sexado</b>	8	116 % <sup>a</sup>	4 (50 %) <sup>a</sup>	4 (50 %) <sup>a</sup>

No se encontró diferencia estadística significativa ( $P>0.05$ ), en el porcentaje del sexo de la crías, numero y sexo de las crías, entre el grupo inseminado con semen sexado y no sexado.

## **X.- DISCUSION.**

Los resultados obtenidos en este estudio, con respecto al sexo de la crías, nos indican que la centrifugación en gradientes de densidad Ficoll-Diatrizoato de sodio, bajo nuestras condiciones no permitió enriquecer las poblaciones de espermatozoides X, contrario a lo reportado por Vázquez (2008), quien reportó un enriquecimiento del 94 %, de los espermatozoides X de bovino, usando exactamente la misma metodología. Es importante señalar que la validación de la separación espermática por este autor fue utilizando PCR tiempo real. Actualmente PCR es la técnica utilizada para la validación de los métodos de sexaje de espermatozoides (Parati *et al.*, 2006. Puglisi *et al.*, 2006); es una técnica con alta sensibilidad y cuantitativa, pero presenta una probabilidad relativamente alta de obtener falsos positivos por contaminación (Liu y Saint, 2002). Shastry (1977) usando semen de humano reporta, con la misma técnica de gradiente, el enriquecimiento de los espermatozoides X (74 %) pero en una de las interfases del gradiente, mientras que en el sedimento encontró mayor porcentaje de espermatozoides Y (72 %). Así los resultados obtenidos en este estudio, pueden ser atribuidos a las diferencias entre especies, ya que la densidad inicial de la muestra influye directamente sobre la separación, es decir los espermatozoides de humano, son más pequeños que los de ovino (Garner 2006), lo que posiblemente influye en la velocidad de sedimentación, ya que esta última es directamente proporcional al peso de la partícula o de la célula (Chang, 1984). Lo anterior hace suponer que se tienen que realizar ajustes en el tiempo y la velocidad de centrifugación, para mejorar los resultados en los espermatozoides de ovino; por ejemplo Vitoria (2007) en el caso del bovino, empleando Percoll en 12 capas, centrifuga el semen por 15 minutos.

Otro punto importante a tomar en consideración es la densidad de la muestra, Vitoria (2007) reporta una concentración espermática para ser sexado en gradiente de  $40 \times 10^6$ , ya que a menor concentración se facilita el movimiento de las células (Vitoria, 2007). Adicionalmente en el semen de humano se han usado

gradientes a base de Ficoll–metrizoato de sodio, reportando el enriquecimiento de la población espermática Y del 76 % y población X del 76%, mientras que en el presente estudio se empleo diatrizoato de sodio en lugar de metrizoato de sodio. Se ha reportado que el metrizoato de sodio tiene una interacción iónica con las moléculas (Rickwood, 1994) y por otro lado se reporta que el espermatozoide de ovino presenta cambios de carga en la membrana, después de que se retira el plasma seminal (Ollero, 1997), por lo que posiblemente el metrizoato puede interaccionar iónicamente con el espermatozoide. También cabe mencionar que la técnica de validación empleada por Shastry, para evaluar la separación espermática fue la tinción de quinacrina. La cual ha sido cuestionada en sus resultados, ya que existen reportes de que no todos los espermatozoides Y presentan el denominado cuerpo Y o F, por lo que los resultados podrían dar falsos positivos o poblaciones en las que predomine la fracción espermática X (Shastry, 1977). Diversos estudios han demostrado que únicamente el 35 % de las células totales, presentan el cuerpo F, mientras otros reportan que solo del 25 al 50 % de los espermatozoides Y lo manifiestan (Lin SP *et al.*, 1998). Por lo que Johnson (2005) plantea que el mejor método para validar una técnica de sexaje de espermatozoides es que esta produzca una desviación del porcentaje del sexo de las crías nacidas, después de la inseminación.

Si bien la centrifugación se ha utilizado como un método de lavado rápido y eficaz, para retirar el plasma y materiales no deseados del semen (Gordon, 1994), existen especies cuyos espermatozoides son altamente sensibles a la fuerza de la centrifugación, como el ratón y el humano, en los que se provoca mayor pérdida de la motilidad, daño a la estructura de la membrana plasmática y acrosoma (Rijsselaere *et al.*, 2002). También se ha reportado que durante la sedimentación de los espermatozoides, causada por la centrifugación, se puede causar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que causa daños irreversibles a la célula, afectado así su capacidad fecundante (Álvarez *et al.*, 1993). En este caso los radicales libres se pueden formar a partir de moléculas

estables y reacciones de transferencia de electrones (Membrillo *et al.*, 2003); produciéndose durante la centrifugación del semen, los cuales pueden generar daño tanto en el ADN como en la membrana plasmática. Jones *et al.*, (1979) reporta un relación entre la peroxidación de los lipidos de la membrana, causada por ROS, y la pérdida de la motilidad. El mecanismo propuesto por el cual la peroxidación causa pérdida de la motilidad, involucra cambios en la fluidez e integridad de la membrana y subsecuentemente la incapacidad para mantener la funciones para el movimiento flagelar (Aitken *et al.*, 1993). También la motilidad puede ser afectada por una inactividad de las mitocondria, causada por ROS (Domínguez *et al.*, 2009).

No solo la centrifugación afecta la viabilidad espermática, sino también la manipulación y , dilución del semen, causa serios daños a la célula espermática, disminuyendo la motilidad y afectando la integridad de la membrana; consecuentemente ocasionando la muerte celular (Hammerstedt *et al.*, 1990).

También se ha reportado que el pasaje de células espermáticas a través de gradientes puede alterar la membrana espermática y causar una reacción acrosomal prematura (Cesari 2006). Sin embargo también se ha indicado que el volumen del gradiente, la fuerza y la duración de la centrifugación no tiene efectos significativos sobre la integridad del espermatozoide. Siendo los espermatozoides bovino y equino, los que muestran baja sensibilidad a la centrifugación, comparada con las de otros mamíferos (Machado *et al.*, 2009). Es decir la disminución en la viabilidad obtenida en nuestro estudio después de la centrifugación en gradientes de densidad puede ser atribuida a todos estos factores.

Otra causa por la cual puede verse afectado el porcentaje de fertilidad es la muerte embrionaria temprana, principal causa de la perdida de gestación en los animales domésticos. En la oveja se ha reportado que entre un 20 y 30 % de los

embriones mueren en los primeros 13 días post-fertilización, debido a factores genéticos y ambientales (Garvierick *et al.*, 1992). La principal causa de la muerte embrionaria temprana es la falla en el reconocimiento materno de la gestación, ya que en ovejas el mantenimiento de la gestación depende de que la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo se mantenga en niveles altos (Mann *et al.*, 1996).

Donovan *et al.* (2004), reporta que el bajo porcentaje de gestaciones, se debe a la no sincronización entre el tiempo de inseminación y la ovulación, y que el mayor porcentaje de gestaciones se obtiene inseminando a las 58 horas después de retirar las esponjas, mientras que en nuestros estudios la ovejas fueron inseminadas a las 48 horas de retiradas las esponjas, pudiendo afectar directamente el porcentaje de gestación. Por otra parte se ha reportado que la aplicación de GnRH en los protocolos de sincronización, incrementa los porcentajes de gestación (Beilby *et al.*, 2009).

Otro de los factores que influyen de manera directa sobre el porcentaje de gestación es la cantidad de espermatozoides inseminados, ya que Leboeuf (2003), reporta 74.2 % de gestaciones al inseminar intrauterinamente con dosis de  $100 \times 10^6$  espermatozoides. Chavez (2007) reporta en ovejas sincronizadas con esponjas intravaginales de 20 mg FGA más 200 UI de eCG e inseminadas intrauterinamente alrededor de 56 horas, 50 % de gestaciones. Comparados con nuestros datos el porcentaje de gestación del grupo inseminado con semen no sexado que fue de 66.6 % similar a lo reportado. Sin embargo el porcentaje de gestación para el grupo inseminado con semen sexado fue de 23.3 %, lo que es bajo comparado con los de semen no sexado. Lo que posiblemente se relaciona con la cantidad de espermatozoides viables inseminados, ya que solo el 52.2 % ( $10.24 \times 10^6$ ) de espermatozoides inseminados presentaban una motilidad progresiva, siendo que la motilidad es indispensable para la que el espermatozoides pueda penetrar la zona pelúcida del ovocito (Suarez y Ho, 2003). De acuerdo con la prueba Hiposmótica-azul de Coomassie 57.2 %

( $11.4 \times 10^6$ ) de espermatozoides son vivos con acrosoma intacto, según Harkema (1998) el acrosoma intacto proporciona al espermatozoide la habilidad para encontrar la zona pelucida del ovocito (Moce y Graham, 2008). Nuestros resultados de la tinción de CTC muestran que solo el 39.6 % ( $7.92 \times 10^6$ ) de los espermatozoides sexados, mostraban un patrón F, característico de espermatozoides no capacitados, siendo estos los espermatozoides con una capacidad fecundante. La capacitación es un complejo de modificaciones que sufre el espermatozoide de manera natural en el tracto reproductor de la hembra, para adquirir la habilidad de fertilizar el ovocito. Los cambios físicos, bioquímicos y biofísicos que ocurren durante la capacitación, incluyen alteraciones en el metabolismo, concentración de iones intracelular, fluidez de la membrana, hiperpolarización de la membrana y concentración de ROS (Grasa *et al.*, 2006). Sin embargo se ha reportado que los espermatozoides capacitados tienen una vida corta y si no se exponen en un tiempo corto al ovocito la fertilidad no ocurre (Watson, 1995). Es decir que para poder obtener porcentajes adecuados de gestaciones, es necesario incrementar la cantidad de espermatozoides fecundantes a inseminar, como lo reporta Hollinshead (2003) que con dosis de 10, 20 y  $40 \times 10^6$  espermatozoides viables, obtuvo 31, 42.9 y 72.7 % de gestación respectivamente.

## **XI.- CONCLUSIONES**

- La técnica de centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-Diatrizoato de sodio, no permitió en este estudio un enriquecimiento de la población espermática X de ovino.
- El pasaje de las células espermáticas a través del gradiente de densidad con Ficoll-Diatrizoato de sodio afectó su viabilidad y consecuentemente la capacidad fecundante.
- Es necesario estandarizar la técnica de centrifugación en gradientes de densidad con Ficoll-Diatrizoato de sodio para espermatozoides de ovino.
- Realizando modificaciones a las variables asociadas como: Menor concentración de la muestra de semen al momento de la centrifugación, pudiendo utilizar de 25 a  $30 \times 10^6$  de espermatozoides por ml. Menor tiempo de centrifugación, pudiendo centrifugar durante 15 minutos. Incrementar la densidad del gradiente.

## XII.- REFERENCIAS

Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Molecular Reproduction Development* 1993; 98:257-265.

Alvarez LJ. Características reproductivas de los ovinos, estacionalidad, anestro, sincronización e inducción del ciclo estral. *Memorias del curso de inseminación artificial en ovinos* 2005:1-6.

Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried RML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1996; 45:943-956.

Arroyo LJ, Gallegos SJ, Villa GA, Berruecos JM, Perera G, Valencias J. Reproductive activity of pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Animal Reproduction Science*. 2007;102:24-30.

Aysa DSJ, Medrano HJA, Villa GA, Romo GS. Producción de embriones de bovino de sexo predeterminado utilizando semen sexado y fertilización *in vitro*. *Memorias del XXIX Congreso Nacional de Buiatría* 2005; 259.

Baker SS, Monzy T, Thaler CD. Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *Journal of Andrology*. 2004; 25: (5) 744-751.

Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Journal Vet*. 2001; 62:508-515.

Bamba K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 1988; 29(6):1245-51.

Beenik FJ, Dmowsky WP, Ericsson RJ. Sex preselection through albumin separation to sperm. *Fertil Steril.* 1993;59(2):382-386.

Beilby K.H, Grupen C.G, Thomson P.C, Maxwell W.M.C, Evans G. The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. *Theriogenology* 2009; 71:829-835.

Bou KM, Chakrabandhu K, Xu H, Weerachayanukul W, Buhr M, Berger T, Carmona E,

Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interaction between somatic cell and germ throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 1990; 43:543-547.

Carvajal G. Cuello C, Ruiz M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology* 2004; 24:389-96.

Catt SL, O'Brien JL, Maxwell WM, Evans G. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reproduction Domestic Animal* 1997; 32:251-258.

Chang W. *Fisicoquímica con aplicación a sistemas biológicos.* CECSA México 1984.

Chávez J. evaluación de la fertilidad y prolificidad en ovejas Suffolk inseminadas intrauterinamente previa sincronización con media esponja impregnada con acetato de fluorogestona. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007.

Chen M, Bongso A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction* 1999; 14(3):759-764.

Clarke J. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone and luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1982;3(5):1137-39.

Cordova A. Inducción y sincronización de cellos en ovejas criollas anestricas estacionales con esponjas vaginales con FGA y PMSG inyectable. *Archivos de Zootecnia* 1999;48:437-440.

Crockett EC, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL. Effects of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology* 2001; 55:793-803.

De Jonge, Barratt C. *The sperm cell*. Editorial Cambridge 2006.

De Loos F, Vliet C, Maurik P, Kruip AM. Morphology of immature bovine oocytes. *Gam Res.* 1989; 24:197-204.

Eckhard M, Brandhorst H, Brendel MD, Bretzel RG. Optimization in osmolality and range of density of a continuous Ficoll-Sodium-Diatrizoate gradient for isopycnic purification of isolated human islets. *Transplantation Proceedings* 2004; 36:2849-2854.

Flaherty SP, Michalowska J, Swann JJ, Dmoski Wp, Mathews CD, Artken RJ. Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa. *Hum Reproduction.* 1997; 12(5):398-42.

Fukui Y. Effect of timing of injection with pregnant mare's serum gonadotropin on fixed-time artificial insemination of seasonally anoestrous ewes. *J Agriculture Science* 1989; 113:361-364.

Galina C, Valencia J. *Reproducción de animales domésticos*. 3era ed. México. Limusa 2008.

Garverick A, Zollers G, Smith F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Animal Reproduction Science* 1992; 28:111-124.

Gillan L, Evans G, Maxwell W. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction Fertil Dev* 1997; 9:481-487.

Graaf SP, Beilby KH, Underwood SL, Evans G, Maxwell WMC. Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule. 2009; 71:89-97.

Graaf SP, Evans G, Maxwell, Downing JA, O'Brien JK. Successful low dose insemination of flow cytometrically sorted ram spermatozoa in sheep. *Reproduction Domestic Animal* 2007; 42:648-653.

Grasa P, Cebrian P, Muiño B. Signal transduction mechanisms involved in *in vitro* ram sperm capacitation. *Reproduction* 2006; 132: 721–732.

Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial Mc Graw Hill 2002.

Hakan O, Bielfeld P, Rajasingam. Increased recovery of viable spermatozoa through oscillating centrifugation. *Fertility and Sterility* 1998; 70(4):712-714.

Hallinshead FK, Gillan L, O'Brien JK, Evans G, Maxwell WMC. In vitro and vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reproduction Fertil Dev* 2003; 15:351-9.

Harkema W, Harrison RA, Miller NG, Topper EK, Woelders H. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of the intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol Reprod* 1998; 58:421–30.

Hernández PJE, Fernández RF, Torres HJG. Capacitación y reacción acrosomal *in vitro* de espermatozoides post-descongelados de ovino. *Salud Animal* 2005; 27(1):41-47.

Jones R, Mann T, Sherins RJ. Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979; 31:531-537.

Karp Gerald. *Biología celular y molecular*. Mc Graw Hill 5ta Ed. 2005.

Kofman-Alfaro, Queipo G. Mensaje Bioquímico, Vol XXIX. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).

Leboeuf B, Forgerit Y, Bernelas D. Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus time of ovulatory LH peak and kidding rate in goat inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 60:1371-1378.

León ZJ. Inseminación intrauterina de borregas domésticas superovuladas con microbombas osmóticas como modelo para borregas cimarrón. Tesis de licenciatura Universidad Nacional Automa de México 2009.

Lin SP, Lee RK, Hwu YM, Lin M. Seaparting X-Bearing human spermtozoa trough a discontinuos Percoll density gradient proved to be inefficient by doublé-label fluorescent in situ hybridization. *Journal Assist Reproduction Genet* 1998; 15(4):565-569.

Luderer AA, Dean WW, Zine AR, Hess DM, Foote RH, Wal RJ. Separation of bovine spermatozoa by density on water insoluble Newtonian gels and their use for insemination. *Biology Repoduction* 1982; 26(5):813-824.

Machado GM, Carvalho JO, Siqueira Filho E, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf P, Dode MAN. Effect of Percoll volumen, duration and forcé of centrifugación, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. Theriogenology 2009; 71:1289-97.

Machatkova M, Krausova K, Jokesa E, TomaneK M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. Theriogenology 2004; 61:329-335.

Mann E, Mann S, Lamming G. The inter-relationship between the maternal hormonal environmental and the embryo during the early stages og pregnancy in the cow. Journal Reproduction Fertility 1996; 55.

Maxwell WMC, Welch GR, Jonhson LA. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting on the presence or absence of seminal plasma. Reproduction Fertil Dev 1997; 8:1165-78-

Meghan C, Wulster, Shiquan Wang, Gregory S. Transcervical artificial insemination in sheep. Theriogenology 2004; 62:990-1002.

Mejia VO. Antecedentes de la inseminación artificial en pequeños rumiantes. Memorias del curso de inseminación artificial en ovino. UNAM 2008:7-13.

Mejia VO. Tecnologías reproductivas en pequeños rumiantes (inseminación artificial y transferencia de embriones. Memorias del Congreso Nacional de Buiatria México 2010:108-118.

Membrillo OA, Córdova IA, Hicks GJJ, Olivares Corichi IM, Martínez TVM, Valencia MJ. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Interciencia 2003; 28(12):699-704.

Moce E, Graham JK. *In vitro* evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2008; 105:104-118

Morrell JM, Johannisson A, Strutz H, Dalin M, Rodriguez Martinez. Colloidal centrifugation of stallion semen: Changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage. *Journal of Equine Veterinary Science* 2009; 29:24-32.

Ock S, Lee SL, Jeon B, Sang Rae, Kumar B, Yang Seok, Sang Yong, Gyu Jin. Isolation and viability of presumptive spermatids collected from bull testes by Percoll density gradient. *Animal Reproduction Science* 2006; 93:144-156.

Ollero M, Pérez R, Gargallo I, Morlenes S, Osada J, Muiño B, Pérez C. Separation of ram spermatozoa bearing X and Y chromosome by centrifugal countercurrent distribution in an aqueous two-phase system. *Journal of Andrology* 2000; 21(6):921-928.

Ordoñez LEA. Producción de embriones ovinos de razas de pelo y lana por medio de fertilización *in vitro*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2005.

Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A. Sex determination in bovine semen, a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* 2006; 66(9):2202-09.

Parilla I, Vázquez JM, Martínez EA. Estado actual de la selección de sexo en el ganado porcino. *Avances en Tecnología Porcinos* 2005; 2(10):57-71.

Pawshe CH, Palanisamy A, Taneja M, Jain SK, Totey. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* of goat oocytes and their early embryonic development and cell number. *Theriogenology* 1996; 46:971-82.

Peng XR, Hsueh AJ, Lapoit PS, Bjersing L, Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 1991; 129:320-27.

Puglisi R, Vanni R, Galli A, Balduzzi D, Parati, K. In vitro fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction* 2006; 132,(3):519-526.

Rodriguez AFA, Cuadras M, Anchondo A, Romo GS, Sanchez BE, Jimenez JA, Alarcon RAD. Heparin level effect on sperm capacitation of fresh and frozen-thawed bovine semen. *Animal Science* 2005; 56:336-38.

Rodriguez MH. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 2007; 68S:S138-S146.

Romo GS. Biotecnología reproductiva avances en ganado bovino. *Veterinaria México* 1997; 24:177-84.

Salamon S, Evans G, Maxwell W. Inseminación artificial de ovejas y cabras. España, Acribia 1990.

Scudamore C, Robinson j, Aitken R, Robertson I. The effect of method of oestrous synchronization on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science* 1993; 34(2):127-133.

Seidel GE Economics of selecting for sex the most important genetic trait. *Theriogenology* 2003; 59(2)585-98.

Seidel GE. Sexing mammalian sperm intertwining of commerce technology and biology. *Animal reproduction* 2005; 59 (2) 145-156.

Seidel GE Jr, Schenk JL. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per insemination and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science* 2008; 105:129-138.

Senger P L. Pathways to pregnancy and parturition 2<sup>nd</sup> edition. Current Conceptions, Inc. USA 2003.

Shastri P. Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X and Y bearing spermatozoa. *Nature* 1977; 269:5860

Suarez SS, Ho HC. Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction Domestic Anim.* 2003; 38:119-124.

Suzuki K, Geshi M, Yamauchi N, Nagai T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. *Animal Reproduction Science* 2003; 77:157-172.

Tulsiani D. Introduction to mammalian reproduction. Editorial Klumer academic publishers. 2003.

Valencia JM. Situación actual y perspectivas del sexado de semen. *Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatría.* 2001. Veracruz México.

Vázquez AM. Métodos físicos de sexaje de espermatozoides de bovino. Tesis de licenciatura. UNAM México 2008.

Vitoria RM. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade contínuo de Percoll e optiprep. Tesis de Doctorado. Universidade Estadual Paulista Brasil 2007.

Vuong N, Kumarathanan P, Wong PTT, Carrier D, Tranphachitr N. Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability

and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Developmental Biology* 2006; 290:220-235.

Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Evans RC, Bunch TD. A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant* 1998; 29:83-88.

Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production, effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation sperm concentration and sire. *Theriogenology* 2002; 57:2105-17.

Wilson RD, Fricke PM, Leibfried RML, Rutledge JJ, Syverson PCM, Weiget KA. *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2006; 65:1007-15.