

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADOR

Separación de los espermatozoides “Y” en ovinos Katahdin en diferentes gradientes de densidad de albumina sérica humana

TESIS

Para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

Presenta:

Margarita Cruz Avendaño

Director de Tesis

Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo

Co- director de Tesis

Dra. Crystelle Alicia Rojas Márquez

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México 2018.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/019
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 24 de mayo de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Margarita Cruz Avendaño**, matrícula **14140005**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Separación de los espermatozoides "Y" en ovinos Katahdin en diferentes gradientes de densidad de albúmina sérica humana**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Margarita Cruz Avendaño
C.c.p. Archivo





UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/024
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 21 de marzo de 2018

C. MARGARITA CRUZ AVENDAÑO

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. José Abad Zavaleta	UNPA	Presidente
Dr. Alfonso Juventino Chay Canul	UJAT	Vocal
Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo	UNPA	Secretario
Dr. Miguel Peña Rico	UNPA	1er Suplente
Dr. Paul Sánchez Ocampo	Cátedras CONACyT	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.



Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Postgrado

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jít



M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo. VICE-RECTORIA
ACADEMICA

C.c.p. Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

DEDICATORIA

Antes que todo le doy gracias a DIOS por permitir lograr un sueño más en mi vida, por obtener buena salud, a mi madre por darme la vida y a mi hijo Miguel por darme la dicha de ser madre, gracias.

Le doy gracias al Arq. Ignacio Landero López, por impulsarme a realizar esta etapa, y por apoyarme en momentos que lo necesitaba, también por darme consejos día a día para que concluyera mi trabajo, MUCHAS GRACIAS.

A mi sobrino Ismael Cruz Rangel, le doy las gracias, por su gran ayuda, que me brindo en todo los momentos que lo buscaba, que aunque ya no esté en esta vida, yo sé que él está con Dios y está feliz, por haber ayudado a toda la gente que le pedía de su apoyo muchas gracias y que Dios te guarde.

A toda mi familia que estuvieron presente en este camino que he recorrido y saben el esfuerzo que he depositado en este trabajo muchas gracias a todos.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad del Papaloapan por permitir realizar mis estudios y la parte experimental de esta investigación.

Al M.C. Héctor López Arjona Por darme la oportunidad de poder realizar la Maestría. Ya que sin su apoyo no hubiera podido estar dentro de la Universidad. Gracias.

A todos los Doctores que forman parte de la Universidad y que fueron parte de mi formación en la maestría, en especial a la **Dra. Crystelle Alicia, Rojas Márquez, Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo**, por su apoyo infinito de poder lograr y realizar mi investigación, también muy agradecida a las **Dra. Blanca Estela Figueroa, Dra. Jaqueline Capataz** por el apoyo al prestarme y permitir utilizar los equipos necesarios en los laboratorios, para realizar mi trabajo.

A los Doctores revisores **Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo, Dr. José Abad Zavaleta, Dr. Miguel Peña Rico, Alfonso Juventino Chay Canul, Paul Mauricio Sánchez Ocampo**. Por dedicarle el tiempo en la revisión de mí trabajo.

En memoria a mi sobrino **Pachi Cruz Rangel+** por su gran ayuda muchas gracias.

También a mis compañeros y amigos, del laboratorio; Rosalía, Raquel y Antonio
“Gracias por su apoyo y amistad.”

ÍNDICE

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
INDICE DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Características de la raza Katahdin.....	3
2.2. Características específicas de la raza	4
2.3. Fisiología reproductiva del macho	4
2.4. Características del espermatozoide	6
2.5. Parámetros de evaluación seminal.....	7
2.5.1. Volumen.....	7
2.5.2. Color	8
2.5.3. Motilidad.....	9
2.5.4. Concentración Espermática.....	11
2.6 Conservación del semen	11
2.6.1 Diluyentes	11
2.6.2 Dilución del semen	12
2.7 Métodos de colección de semen.....	12
2.7.1 Vagina artificial.....	13
2.8 Métodos de separación espermática.....	14
2.8.1. Citometría de flujo	14
2.8.2 Centrifugación en gradientes de densidad.....	16
2.8.3 Técnica Swim-Up.....	17
2.8.4 Técnica con gradientes Percoll	17
2.8.5 Sensibilidad al pH.....	18

2.8.6 Carga eléctrica de la superficie de la membrana	18
2.8.7 Columnas de albúmina	19
2.9 Extracción de ADN	20
2.10 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)	21
2.11 Importancia del gen AMEL.....	22
2.12 Identificación de oligonucleótidos en las bases de datos para la determinación del sexo en PCR punto final.....	23
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo general.....	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
5.1 Ubicación.....	27
5.2 Eyaculados	27
5.3 Obtención de eyaculados	27
5.4. Dilución del espermatozoide	28
5.5 Preparación de las columnas.....	28
5.6 Separación de columnas	28
5.7 Evaluaciones espermáticas.....	29
5.7.1 Motilidad espermática pre y post separación.....	29
5.7.2 Concentración espermática pre y post separación.....	29
5.8. Prelavado de las muestras separadas por columnas de albúmina	29
5.9 Técnica de extracción de ADN genómico.....	30
5.10 Identificación de los cromosomas Y, por PCR, en las columnas de albúmina del 10,15, y 20 %	30
5.11. Análisis estadístico	31
6. RESULTADOS Y DISCUSION	32
6.1. Motilidad, concentración y vitalidad.....	32
6.2. Extracción de ADN	35
6.3 Verificación por PCR	37
7. DISCUSIÓN.....	39
7.1. Valores generales.....	39

7.2. Motilidad espermática	39
7.3. Concentración espermática	41
7.4. Vitalidad.....	42
7.5. Verificación por PCR.....	43
8. CONCLUSIÓN.....	46
9. PERSPECTIVAS.....	47
10. LITERATURA CITADA.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencia del contenido de ADN.....	15
Tabla 2. Números de eyaculados, valores promedios de volumen, pH y concentración inicial.....	32
Tabla 3. Valores de motilidad de semen ovino puro y diluido de cada uno de los gradientes HSA.....	33
Tabla 4. Concentración en los diferentes gradientes de concentración de HSA de semen puro y diluido.....	34
Tabla 5. Porcentaje de vitalidad de espermatozoides provenientes del gradiente al 20 % de HSA.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del espermatozoide.....	6
Figuras 2. A) Semen en buen estado. B) Semen contaminado de orina y sangre	8
Figura 3. La determinación del sexo basado en el gen AMELY amplificación (AMELX AMELY en machos, hembras, especies salvajes y domésticos.....	24
Figura 4. ADN genómico de controles positivos y muestras de columnas, sin prelavado, con prelavado.....	36
Figura 5. ADN genómico obtenido a partir de espermatozoides sometidos a columnas de albumina sérica humana.....	37
Figura 6. Identificación de los espermatozoides “Y” por la técnica de PCR.....	38

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ASB	Albumina sérica bovina
Casa	Análisis asistido de los espermatozoides por medio de computación
dNTP	Deoxinucleotido trifosfato
Esp.	Espermatozoides
G	Gramos
HSA	Albumina sérica humana
IA	Inseminación artificial
Kg	Kilogramo
Min	Minuto
mL	Milímetro
H	Hora
S	Segundo
Sem	Semana
SS	Semen sexado
rpm	Revoluciones por minutos
PCR	Reacción de cadena de la polimerasa
SD	Semen diluido
SSD	Semen sin diluir
Ds	Días
µL	Microlitros
pMol	Picomoles

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue separar espermatozoides "Y" provenientes de eyaculados ovinos mediante gradientes de densidad de HSA, se utilizaron 40 eyaculados, los cuales se dividieron en dos tratamientos: SSD (semen sin diluir) y SD (semen diluido) y fueron sometidos para su separación a tres gradientes (10, 15 y 20 %) de concentración de HSA, incubados a 37 °C durante 1 h. Se evaluó la motilidad, concentración y vitalidad espermática pre y post separación, se identificó el repertorio de espermatozoides "Y" mediante la amplificación específica del gen que codifica la proteína Amelogenina mediante la técnica de PCR. La motilidad del gradiente final (20 % HSA, 83.15 ± 1.56) no muestra diferencia significativa comparada con el valor inicial de motilidad (88.00 ± 2.10), la vitalidad de los espermatozoides aumento significativamente ($P \leq 0.05$) en el semen sexado con respecto al semen sin sexar, sin embargo, para el semen sexado no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre gradientes, se identificando el gen Amelogenina, en los espermatozoides del gradiente de concentración del 20 % HSA contra el control positivo, observando un mismo tamaño de banda, por lo cual se infiere una mayor concentración de espermatozoides portadores del cromosoma "Y" en dicho gradiente, siendo igual al control positivo, dicha expresión es igual para los tratamientos de semen sexado y sin sexar. En conclusión, la técnica de gradiente de densidad permite seleccionar subpoblaciones de espermatozoides Y mediante el gradiente de 20% de HSA, misma que puede ser verificada mediante la técnica de PCR.

Palabras Clave: semen sexado, espermatozoides, gen Amelogenina

ABSTRACT

The objective of the present study was to separate "Y" sperm from ovine ejaculates using density gradients of HSA, 40 ejaculates were used, which were divided into two treatments: SSD (undiluted semen) and SD (diluted semen) and were submitted for separation to three gradients (10, 15 and 20%) of HSA concentration, incubated at 37 ° C for 1 h. Sperm motility, concentration and vitality were evaluated before and after separation, the "Y" sperm repertoire was identified by means of the specific amplification of the gene that encodes the Amelogenin protein by means of the PCR technique. The motility of the final gradient (20% HSA, 83.15 ± 1.56) does not show significant difference compared to the initial value of motility (88.00 ± 2.10), the vitality of the sperm significantly increased ($P \leq 0.05$) in the sexed semen with respect to the semen without sexing, however, for the semen sexed there was no significant difference ($P \geq 0.05$) between gradients, the Amelogenin gene was identified, in spermatozoa of the concentration gradient of 20% HSA against the positive control, observing a same band size, for which a higher concentration is inferred of spermatozoa carrying the "Y" chromosome in said gradient, being equal to the positive control, said expression is equal for the sexed and unsexed semen attachments. In conclusion, the density gradient technique allows the selection of subpopulations of Y sperm using the 20% gradient of HSA, which can be verified using the PCR technique.

Key Words: sexed semen, sperm, Amelogenin gene

1. INTRODUCCIÓN

La preselección del sexo de la progenie o la desviación de la media hacia machos o hembras representaría una herramienta productiva de suma utilidad para la industria pecuaria, la aceleración en los programas de mejoramiento genético, el incremento en la eficiencia biológica y económica de la producción y una mayor flexibilidad en los sistemas de manejo son algunas de las ventajas que esta técnica puede aportar a las explotaciones ganaderas (Faber *et al.*, 2003). La FAO reconoce el impacto que ha generado el uso de la preselección del sexo en la producción pecuaria a través del uso de semen sexado en combinación con la biología molecular, y su contribución a satisfacer la creciente demanda en la producción de alimentos (Niemann *et al.*, 2011). Se han desarrollado diversas técnicas para separar los espermatozoides basándose en la detección de por lo menos una de las siguientes diferencias entre estos dos tipos celulares (X , Y): sensibilidad al pH (Unterberger 1932), carga eléctrica de la superficie de la membrana (Gordon, 1957), velocidad de migración (Wolf *et al.*, 2008), *Diferencias de densidad (Iizuka et al., 1987)*, contenido de ADN (Citometría de flujo) (Flaherty *et al.*, 1996), siendo esta última técnica la que mejores resultados brinda actualmente, presentando purezas de alrededor de 90-95 % (Johnson *et al.*, 1989) sin embargo no está exenta de problemas, debido sobre todo a la capacidad de fecundación disminuida que muestran los espermatozoides sometidos a este proceso (Cran *et al.*, 1993), además esta técnica utiliza equipos costosos y puede ser no operable a nivel práctico (Seidel, 2003).

Una metodología sencilla y de bajo costo es la técnica de gradientes de densidad, la cual es capaz de separar células X y Y sin causar daños sobre la viabilidad del espermatozoide (Ericsson *et al.*, 1973; Beernink *et al.*, 1993). Sin embargo, los resultados en términos de eficacia en la tasa de sexado espermático logrados a través de esta técnica se muestran muy variables, las metodologías de trabajo difieren entre las investigaciones realizadas, por ejemplo, en humanos mostraron resultados favorables (Ericsson *et al.*, 1973) así como en vacunos (Beal *et al.*, 1984), pero también existen trabajos de investigación cuyos resultados muestran la ineffectividad de este dicho método (Flaherty *et al.*, 1997).

Uno de los Problemas asociados con esto es probablemente la validación de los cromosomas X y Y. Por lo tanto, se requiere la implementación de un método rápido, eficaz y preciso, la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede ser una estrategia esencial para determinar la pureza de la muestra y predecir la proporción de sexo de la descendencia.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Características de la raza Katahdin

En la región noroeste, donde los tipos de climas son habitualmente desiertos, los ovinos de pelo en especial la raza Pelibuey es muy utilizada, sin embargo, no es tan productiva respecto a la ganancia de peso, razón por la cual los productores han optado por introducir otras razas como la Katahdin, debido a que se adaptan a cualquier clima de la región, no presentan problemas de reproducción y obtienen mayor ganancia de peso. Bajo estos objetivos la raza Katahdin muestra una enorme reproducción, rusticidad y adaptación, favoreciendo en regenerar la validez productora de los rebaños debido a su factible manejo y pequeños costos de producción (Avendaño *et al.*, 2004).

Esta actividad de la producción de ovino ha inducido recientemente que ovinocultores de la región trópico que introduzcan a sus rebaños sementales de razas altamente competitivas en la producción de carne para realizar diferentes cruzamientos, tales como Katahdin. El consumo de ganado ovino, en los Estados de México e Hidalgo tiene una alta demanda, por lo que, se ha tenido que importar de otros países para poder abastecer el mercado mexicano. (SIAP 2011).

La raza Katahdin se desarrolló en el sur de Estados Unidos se ha mencionado que tiene un buen desempeño productivo y reproductivo en ambientes tropicales y áridos (Burke y Apple 2007). Se ha observado que los cruzamientos entre hembras Pelibuey

y sementales Katahdin promueven corderos para el abasto que presentan tallas de crecimiento superiores a los Pelibuey puros, así como buena adaptación en climas áridos (Avendaño *et al.*, 2004). Por lo tanto, los cruzamientos de la raza Katahdin con otras razas permiten la obtención de animales más pesados, con un crecimiento más rápido, lo cual permite ser más competitivo en la producción de carne.

2.2. Características específicas de la raza

La raza Katahdin es producto del cruzamiento de ovinos de pelo, procedentes de las Antillas e Islas Vírgenes, con carneros Suffolk, Southdown, Dorset y Wiltshire Horn. Presenta color rojo o blanco con algunas tonalidades; los pesos adultos varían entre 70 y 80 kg para los machos y 55 a 60 kg para las hembras. Esta raza presenta como características principales, la eliminación de una capa de lana en ciertas estaciones del año, lo que le permite tener una gran adaptabilidad a las diferentes regiones del país. Además, sus crías presentan una alta ganancia diaria de peso, que varía de 260 a 400 g por animal, dependiendo el tipo de parto que tenga, ya sea único, doble o triple y así como un rápido crecimiento, lo que le permite superar a otras razas (AMCO, 2007).

2.3. Fisiología reproductiva del macho

Una de la importancia que se debe de tener en cuenta antes de la reproducción, es de saber las características que tienen que tener los sementales en cuanto a su

aparato reproductor, al igual que los vientres, cuando se desee realizar una inseminación artificial, ver que estén en buenas condiciones físicas, por ejemplo un buen tamaño, así mismo que no presenten problemas genéticos, de gran importancia para tener un buen desarrollo en la producción de semen, en los machos, Para esto, es preciso que el macho genere las hormonas necesarias para que tenga la maduración sexual del mismo. (Méndez *et al.*, 2009).

Los testículos son órganos primarios que poseen como función fundamental la creación de espermatozoides (*función exocrina*) y la producción de hormonas esteroides (*función endocrina*). Los machos alcanzan la madurez sexual en la pubertad, fase en la cual los órganos reproductores se vuelven fértiles. Esto sucede entre los 5 y 7 meses de edad, cuando el animal obtiene entre el 50 - 60 % de su peso formal (Galina *et al.*, 2006). El semen es un líquido celular concentrado que contiene los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones del aparato reproductor que se mezclan en el momento de la eyaculación (Knobil *et al.*, 2003). La cantidad espermas q se obtienen los machos es aproximadamente de 49 ds (7 sem). El tamaño testicular es un indicador de la habilidad del macho de producir espermatozoides (Handbook 2002).

Los métodos reproductivos en mamíferos son muy perceptivos a los efectos de la fiebre en ambos sexos, empezando como un resultado de gran importancia la disminución en la cantidad y calidad de los espermatozoides en el macho y la disminución de la fertilidad de las hembras (Ozawa *et al.*, 2004; Banks *et al.*, 2005;

Yaeram *et al.*, 2006) por lo que, en períodos de mucho calor, se observa muy baja fertilidad de los machos.

2.4. Características del espermatozoide

Los espermatozoides son gametos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Son células alargadas estables con cabeza aplanada portadora del núcleo y cola que es el órgano necesario para la motilidad celular (Knobil *et al.*, 2003).

Esta célula especializada tiene como función la fecundación del ovocito (Urbina y Quito, 2013) Entre de sus características morfológicas la cabeza es una de las partes de mayor importancia teniendo su capacidad para penetrar la célula y colocar el material genético. El acrosoma es un saco delgado membranoso en forma de casquete, que contiene enzimas acrosina, hialuronidasa. Así mismo, la cola forma la porción motora de la célula para poder adquirir al ovocito. Por todas estas particularidades se derivan muchas ideas de gran importancia donde evaluar al semen procedente de ovinos antes de la determinación del sexado del mismo (Olivera 2009).

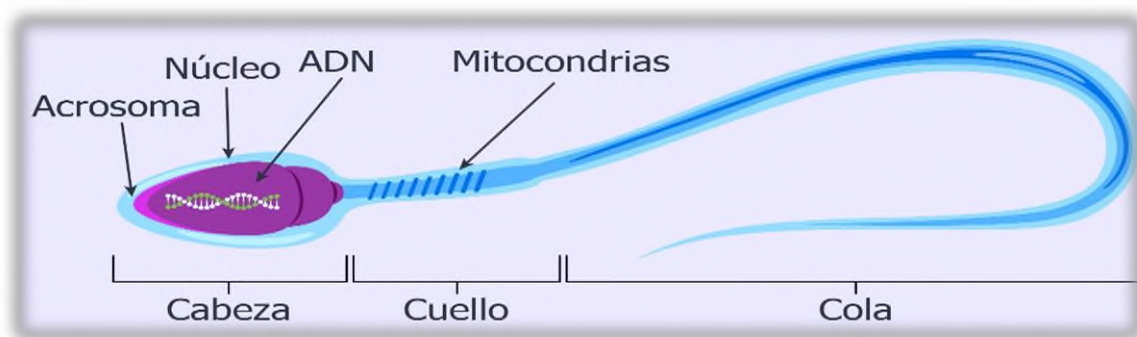


Figura 1. Morfología del Espermatozoide.(imagen modificada por MCA).

2.5. Parámetros de evaluación seminal

Existen diversos parámetros para la evaluación de la característica del semen Ovino. Entre las evaluaciones se tienen: volumen, aspecto, motilidad individual, pH, concentración espermática y vitalidad *espermática*, así como evaluaciones bioquímicas y pruebas funcionales. En cuanto a la proporción del volumen de semen, este es de gran importancia por el número de dosis que pueden obtenerse a partir del eyaculado. Del mismo modo, la prueba de la motilidad progresiva es una medida aproximada de la viabilidad del semen (Urbina, 2012).

En este trabajo se evaluaron los siguientes parámetros: volumen, color, motilidad y concentración, para llevar a cabo la separación del cromosoma Y, en espermatozoides de ovinos.

2.5 1. Volumen

El volumen del eyaculado varía de acuerdo con el método de recogida, la edad y etapa del macho, las continuidades, la práctica del recolector y la frecuencia de obtención de muestras. Si las muestras se recogen tres o más veces al día o durante períodos extensos, el volumen disminuye, lo mismo cuando el semen es recolectado con un electro-eyaculador, el semental tiende a orinar y las muestras son contaminadas. Por lo tanto, es de gran importancia la forma de recolectar el semen por medio de una vagina artificial. El volumen es de 0.5 a 2 mL en animales maduros, y de 0.5 a 0.7 mL

en los jóvenes, ya que si no se cumplen estos parámetros se considera una muestra de baja calidad para su evaluación (Hafez *et al.*, 2002).

2.5.2. Color

Otros de los puntos importantes es el color del semen, este es evaluado teniendo en cuenta su coloración y consistencia. El eyaculado del ovino varía de blanco-lechoso a cremoso pálido. Su color proporciona una idea de concentración espermática. Cuanto más *blanco lechoso*, mayor es su concentración. Además, la apariencia permite establecer la presencia de urospermia y hemospermia. Tanto la orina como la sangre tienen efecto negativo sobre los espermatozoides, porque influyen negativamente sobre la calidad, indicando además transformaciones orgánicas que deben ser diagnosticadas y tratadas. Cuando semen es inodoro, en caso de urospermia, su presencia puede ser detectada por el olor a orina en el eyaculado (Brass *et al.*, 2008).

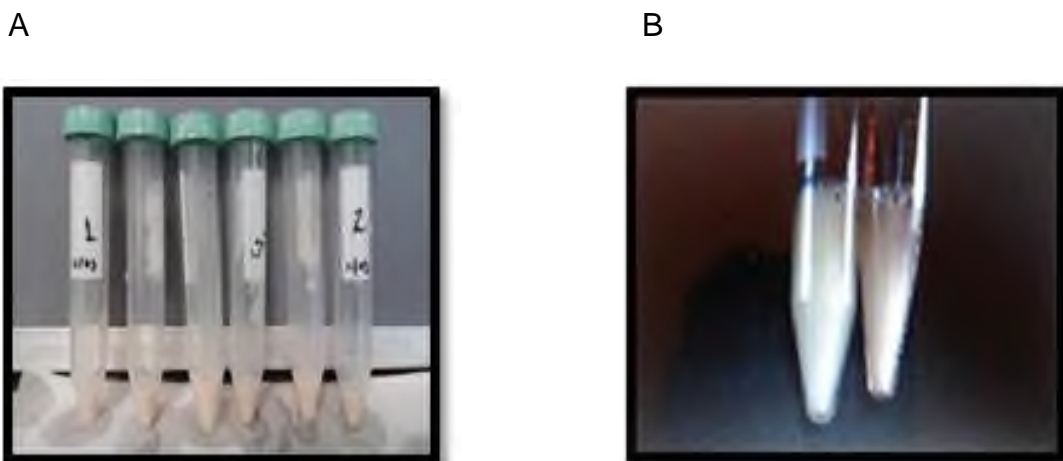


Figura 2. A) Semen en buen estado.

B) Semen contaminado de orina y sangre.

2.5.3. Motilidad

Para que el espermatozoide sea capaz de fecundar un ovocito debe tener una serie de características, y una de ellas, es la motilidad progresiva. Este parámetro ha sido y continúa siendo el más manipulado para evaluar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento eficaz de los espermatozoides es necesario para la migración del oviducto durante el período de transferencia espermática mantenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una expresión de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con una proporción baja de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será eliminado para el procesamiento de la fertilización (Van-Look, 2004).

La motilidad espermática regularmente se evalúa de forma individual, mediante un análisis de una muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina a 37 °C. El eyaculado de los rumiantes, facilita su elevada concentración espermática, se puede estimar la motilidad masal definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Regularmente la motilidad masal se evalúa de forma individual en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se miran oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas. La motilidad ideal de una muestra es del 80 % con un rango entre el 70-90 % (Mobini, 2002; Hafez *et al.*, 2002).

Una evaluación visual de la motilidad debe ser efectuada en todas las muestras de semen porque así se identifican las muestras que probablemente presenten baja fertilidad (Graham, 2001). La motilidad espermática progresiva, la cual es un movimiento con dirección de progresivo, se observa en aquellos espermatozoides que presentan una serie de propiedades estructurales y fisiológicas altamente relacionadas con la fertilidad (Gil *et al.*, 2004). La motilidad espermática puede ser evaluada mediante el método visual, individual, o utilizando sistemas computarizados. El análisis de los espermatozoides, asistido por medio de computación (computer assisted sperm analysis, CASA), permite evaluar en una forma rápida y positiva la motilidad, velocidad y morfología espermática (Graham *et al.*, 2005).

El sistema CASA consta de varios dispositivos interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de pantalla. Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo en el microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 seg, análisis de motilidad: establece una clasificación entre espermatozoides estáticos y móviles, y a su vez los móviles los clasifica según su trayectoria en progresivos y no progresivos (Cseh *et al.*, 2004).

2.5.4. Concentración Espermática

La concentración espermática se especifica como el número de espermatozoides por unidad de volumen, formulada normalmente en millones por mL de eyaculado (esp/mL). Son varias las técnicas que permiten determinar la concentración espermática. Entre ellas, se encuentran el recuento de la cámara de Neubauer y el método de fotolorimetría. Ambas técnicas son precisas y si bien el fotolorímetro permite un recuento más rápido, su costo es más elevado que la cámara de Neubauer (Gibbons, 2004).

2.6 Conservación del semen

2.6.1 Diluyentes

La yema de huevo se maneja como un agente preservador de la membrana plasmática y acrosómica del espermatozoide contra el choque térmico por frío y como amortiguador osmótico. La protección que ejerce en la congelación se da por la adhesión a la membrana plasmática, especialmente dada por la fracción lipídica de la yema de huevo (lecitina y cefalina) lipoproteica de baja densidad, que surge como efecto de conservador (Buitrago - Peña *et al.*, 2008).

El citrato de sódico y la glucosa son nutrientes para el espermatozoide, mismos que favorecen las anabiosis, acto de revivir después de una muerte aparente, la cual surge al momento en que el semen es recolectado, y por el tiempo de transporte al ser

llevado al lugar indicado para su evaluación en el laboratorio. (Jiménez *et al.*, 2004; Tobar, 2005).

2.6.2 Dilución del semen

La dilución del semen se debe hacer tan pronto como se pueda una vez recolectado y utilizado de forma rutinaria. Tanto el semen como el diluyente se colocan en baño maría a 37 °C para que al momento de la dilución tenga la misma temperatura. El diluyente se debe colocar a baño maría antes que el semen (Etel y Sales, 2000).

La añadidura de diluyente frío al semen puede producir shock por frío asociado con una baja fertilidad. La dilución se realiza pipeteando una cantidad adecuada de diluyente (esto va a depender de la cantidad de dilución) y colocándolo lentamente el recipiente donde se encuentre el semen, ya que pueden alterarse los espermatozoides con lo que se reducirá su motilidad. Después de adicionar el diluyente se agita todo lentamente y se examina al microscopio para comprobar la motilidad de los espermatozoides (Hafez *et al.*, 2002).

2.7 Métodos de colección de semen

Para que un eyaculado presente excelentes características biológicas, es preciso que los sementales se encuentren en perfectas condiciones y que la técnica empleada para la obtención de este sea utilizada correctamente. Las células espermáticas son muy sensibles a factores ambientales, luz solar, agua, jabón, soluciones, cambios bruscos

de temperatura, etc., el eyaculado se debe manejar de manera antiséptica, germicida cuidadosa desde su recolección hasta su procesamiento, con el fin de mantener las características espermáticas (Salomón *et al.*, 2000).

El eyaculado puede ser colectado mediante vagina artificial o a través de estimulación eléctrica como el electroeyaculador, este método no es tan recomendado ya que le presenta estrés al semental, y también podemos obtener muestras con muy baja calidad, en la motilidad, o también siendo contaminadas por la orina, solo en casos muy extremos se puede utilizar, o cuando un semental tiene muy buena genética y no es adaptado a la vagina artificial, pero se tienen que tomar mucha precaución en no obtener muestras de mala calidad (Donovan *et al.*, 2001). El método más recomendado es la vagina artificial ya que no se le hace ningún daño al semental ni obtendremos muestras de mala calidad para el análisis que se le pretenda realizar (Álvarez *et al.*, 2000; Jannet *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002).

2.7.1 Vagina artificial

La vagina artificial consta de un tubo rígido de hule, con una válvula exterior; por el lumen del tubo se introduce una manga de látex, la que se dobla sobre los extremos del tubo, creando así una recámara de aire. Después un cono de látex con un tubo de centrifuga graduado, se fija a uno de los extremos y al tubo de hule se le introduce agua caliente; para efectuar la colección de semen, los ovinos requieren que la vagina tenga una temperatura de 40 a 45 °C en toros de 42 a 45 °C. Para la monta se utiliza un señuelo que puede ser una oveja, un macho o un maniquí. Antes de colectar el

semen se debe de tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental (Galina *et al.*, 2006).

El método más positivo para estimular el ovino o el toro es la monta falsa, que con la palma de la mano desviar el prepucio y no dejar que penetre a la vagina. Después de algunos segundos del intento de búsqueda de la vagina, el animal desciende; nunca se deberá tocar con la mano la mucosa del pene. En el siguiente intento de monta se coloca la punta del pene desviado en la entrada de la vagina; inmediatamente el ovino se lanza hacia adelante en un empuje final que acompaña a la eyaculación. La monta falsa en ovino y toro aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y motilidad (Galina *et al.*, 2006)

2.8 Métodos de separación espermática

2.8.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método confiable y eficaz para llevar a cabo la separación espermática y lograr descendencia del sexo deseado (Maxwell *et al.*, 2004). Los métodos utilizados para separar los espermatozoides en mamíferos se basan en la demostración que aquellos espermatozoides portadores del cromosoma X tienen mayor peso que los espermatozoides portadores del cromosoma Y, debido a una mayor cantidad de cromatina. La cantidad de ADN del cromosoma X en relación con el cromosoma Y varía significativamente entre las especies. Las diferencias del

contenido de ADN entre los espermatozoides X y Y, fueron calculadas por medio de citometría de flujo (Garner, 2006).

Tabla 1. Diferencia del contenido de ADN (Garner, 2006).

ESPECIE	DIFERENCIA X y Y (%)
Humano	2.8
Bovino	3.8
Caprino	3.5
Ovina	4.2
Porcina	3.6
Cunícola	3.0

Cuando el ADN espermático se tiñe con un colorante específico, que es excitado por una luz ultravioleta emitida por un rayo láser, este creará una fluorescencia que será 4 % mayor para el espermatozoide que contiene el cromosoma X comparado con su contraparte Y. Este proceso, aunque muy lento (con los equipamientos actuales pueden producirse unas 6-8 dosis inseminantes por h.), también presenta una eficacia promedio del 90 % en la separación de los espermias. Aunque ya pasaron casi veinte años desde el primer reporte de mamíferos nacidos vivos por esta técnica, no fue sino hasta el año 2000 en que la tecnología se lanzó comercialmente. De todas formas, podría afirmarse que recientemente a partir del año 2004/5, cuando los grandes centros de inseminación artificial en el mundo (Select Sires, ABS, Genex, Semex, etc.)

comenzaron a incorporar la tecnología, el SS empezó a consolidarse como una herramienta biotecnológica (Ferré y Cattaneo, 2013).

Una de las desventajas de la citometría de flujo es la reducida vida útil de los espermatozoides debido al extremo proceso de separación, determinando que su viabilidad y capacidad fecundante se vean afectadas debido a daños a la membrana y a la reacción acrosomal (Blondin *et al.*, 2009). Otra desventaja de esta técnica es el alto costo y difícil acceso a esta tecnología en el equipo, que se requiere de mano de obra muy especializada para poder procesar las muestras de semen (Vries *et al.*, 2008).

2.8.2 Centrifugación en gradientes de densidad

Esta técnica retira a los espermatozoides acorde a sus ligerezas de precipitación por centrifugación en gradientes de diferente densidad, siempre que la densidad del material del gradiente sea menor que la de los espermatozoides; el espacio requerido para la separación es corto (Beernink, 1984). El procedimiento consiste en preparar dos soluciones de diferente concentración (35 y 84 %) con medio Ham's F10 y Albumina sérica Humana (HSA) y colocarlas en un tubo cónico; después se coloca una alícuota de semen sobre la solución de menor concentración y se centrifuga a 200 rpm durante 8 min. Los espermatozoides contenidos en la fracción de mayor concentración (84 %) se centrifugan a 800 g por 5 min y el sedimento celular se lava tres veces con una solución buffer a base de fosfatos (Wang, 1994).

2.8.3 Técnica Swim-Up

La técnica de migración de los espermatozoides busca obtener la separación de espermatozoides “Y” del eyaculado, la obtención de pool heterospermático de los eyaculados se realiza mediante centrifugación por 3 min, a 800 rpm (3 G). Luego de la centrifugación, la muestra se incuba a 37 °C por 45 min, con una inclinación de 45 °C para facilitar la migración ascendente de los espermatozoides motiles. Transcurrido el tiempo, se toman 15 µL y se observan al microscopio. Se evalúa la concentración y posteriormente la migración por Swim-up. Una vez probada la muestra, se realiza una aspiración de la parte superior del tubo, una pequeña fracción es resuspendida en un diluyente gelificante a 19 °C con el fin de facilitar el transporte (Copello, 2011).

2.8.4 Técnica con gradientes Percoll

Para obtener la separación de espermatozoides X, se utilizan gradientes de Percoll® (Sigma P1644.) de 45 y 90 %. Se preparan las columnas con 162 mL de Percoll al 90 %, se colocan suavemente 2 mL de Percoll al 45 % y se mantienen en baño termo estatizado a 37 °C. Sobre las columnas de gradientes preparadas se agregaron 2 mL de la muestra heterospermática de semen, formándose tres capas visibles. En estudios realizados in vivo con semen sometido al proceso de Swim-up, se obtuvieron de 171 animales nacidos vivos, de los cuales el 63.74 % (109) resultaron ser machos.

2.8.5 Sensibilidad al pH

Un líquido seminal muy alcalino (básico) beneficiaba la sobrevivencia de los espermatozoides portadores del cromosoma Y. Además, que el medio vaginal muy ácido ayudaría los portadores del cromosoma X. Este método fue manipulado en conejos por Wakim, (1972), en donde explicó que la proporción de sexos puede ser modificada de acuerdo con el pH de la vagina a la hora del apareamiento. Cuando el pH se encuentra entre 6.5-7.5 prevaleció el sexo femenino, y con un pH de 7.5-8.3 se podría esperar animales de sexo masculino (Unterberger, 1932).

2.8.6 Carga eléctrica de la superficie de la membrana

Entre los años 1932 y 1949 se llevaron a cabo los primeros experimentos en conejos para separar por medio de electroforesis, técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico, los espermatozoides portadores del cromosoma X, de aquellos portadores del cromosoma Y. Estudios reportan 62 % de hembras y 25 % de machos de los animales nacidos a partir de la IA. Con espermatozoides que migraron para el ánodo y el cátodo respectivamente (Gordon, 1957).

En esta técnica, los espermatozoides inactivos son atraídos hacia el ánodo en un pH neutro. Cuando la disociación electroforética se realiza en condiciones conforme con la motilidad espermática, los espermatozoides migran hacia el cátodo. Estas células son puestas por un campo eléctrico y se deslizan en la dirección de su cabeza. Si se

cargan negativamente, los espermatozoides pueden ubicarse de modo que la cola apunte al ánodo en virtud de su mayor peso de carga negativa, y su motilidad intrínseca es mayor que la electroforética (Beernink, 1984).

2.8.7 Columnas de albúmina

Entre las diferentes técnicas para llevar acabo la separación de espermatozoides existe la de gradientes de concentración, que consiste en la sedimentación de una esfera a través de un fluido viscoso a bajo número (Mc Donal y Burns. 1978; López *et al.*, 1992), esta técnica de columnas de albumina, la cual se puede adaptar en cualquier unidad de producción debido a que hay una desviación de la proporción de sexo, y los costos del equipo y materiales no son elevados. La confiabilidad de esta técnica es de 70 a 80 %, utilizando gradientes a base HSA en diferentes concentraciones.

La técnica se basa en que los espermatozoides portadores del cromosoma sexual Y son menos pesados pues contienen un menor porcentaje de ADN que los espermatozoides portadores del cromosoma sexual X (Cran *et al.*, 1995). Garner, (2006), reporta una diferencia de 4.2 % en ovinos; por lo tanto, al ser más livianos los espermatozoides portadores del cromosoma sexual Y se pueden desplazar más rápidos en las fracciones de albúmina de mayor concentración. Por su parte, Silverman *et al.* (2002), al utilizar la técnica de columnas de albúmina en humanos, modificando las concentraciones de las fracciones a 7.5 y 17.5 %, reportan una desviación hacia el sexo femenino en partos simple de 72.3 % y en partos gemelares de 66.7 % fueron.

En conejos, Hernández *et al.* (2008), reportan 72 % de machos y 27 % de hembras al inseminar conejas con espermatozoides de la fracción de HSA al 20 %.

2.9 Extracción de ADN

La obtención de ADN íntegro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular. Una de las ventajas de utilizar métodos tradicionales es su bajo costo, así como un alto rendimiento. El rendimiento de los Kits depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, así como de la capacidad de unión de la membrana (Tang *et al.*, 2005). A partir de los años 90 se introdujeron al mercado kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las bio-molecular, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores. Los combos se venden en presentación de membranas de sílice o perlas magnéticas, las primeras están formadas por una resina y las segundas consisten de un centro de hierro recubierto por resina. La membrana está insertada dentro de un microtubo de polipropileno y las microesferas se encuentran suspendido en una solución amortiguadora (Dundass *et al.*, 2008).

Durante la extracción, el ADN cargado negativamente se adsorbe o une a la matriz selectiva de manera reversible y se mantiene unido a ésta durante remoción de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, posteriormente la molécula se libera de la matriz quedando solo el ADN inmerso en la placa de la sílice, y así mismo, es removida o recogida con agua estéril para poder obtenerlo y darle el uso necesario para cualquier

experimento o trabajo que se desee llevar a cabo dentro de una investigación de lo contrario para ser analizado en los laboratorios y poder concluir que actividad se desee llevar con la prueba (Guevara, 2003).

2.10 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)

La tecnología de PCR en tiempo real ha demostrado su versatilidad y utilidad en diversos campos de la investigación biomédica y el diagnóstico biomolecular, siendo la gran aplicación de investigadores y fabricantes de nuevos equipos, productos y servicios asociados a estas ramas del conocimiento. Entre los campos de operación que más acuden a esta tecnología se describen la virología, la microbiología clínica y la investigación biomédica, aunque existen otras como las industrias alimenticias y farmacéuticas que han hecho o harán uso de esta tecnología. Las técnicas asociadas a la PCR han avanzado de forma acelerada en los últimos años y cada vez se encuentran nuevas aplicaciones a la PCR. El avance tecnológico actual ha proporcionado a la técnica un mayor poder de resolución al lograr la amplificación a partir de una molécula de ácido nucleico empleando técnicas de la nanotecnología (Lagally et al., 2001).

Esta técnica molecular permite el análisis del ADN, consiste en la amplificación de fragmentos de ADN flaqueado por dos oligonucleótidos que hibridan a la doble cadena de ADN reconociendo el sitio de unión específico (Persing *et al.*, 1993). Este procedimiento se lleva a cabo en tres etapas a temperaturas diferentes con una repetición de 25-40 veces (ciclos). La primera es la desnaturalización del ADN a una

temperatura de 95-98 °C logrando así la separación de las hebras. La segunda etapa consiste en el alineamiento de los oligonucleótidos que hibridan una región específica a una temperatura de 58-60 °C y en la última etapa (elongación) interviene la DNA polimerasa que se encarga de sintetizar la nueva cadena de ADN a una temperatura aproximada de 70-72 °C , generando millones de copias, debido a que cada ciclo duplica la cantidad de ADN sintetizado lo que da como resultado una amplificación exponencial(2^n , donde n es el número de ciclos) (Timothy et al., 1998).

2 .11 Importancia del gen AMEL

El gen AMEL, es un gen funcional que codifica una proteína, la cual está presente en mayor concentración en el esmalte dental durante el desarrollo (Eastoe, 1965).

AMEL bovino fue aislado, clonado y secuenciado parcialmente por Shimokawa en 1987, el gen AMEL humano, presente en los cromosomas X y Y, está formado por 7 exones y ambas copias codifican una proteína, la amelogenina.

Por lo tanto, en humano existen dos genes que codifican esta proteína, uno localizado en el cromosoma X denominado AMELX y otro ubicado en el cromosoma Y llamado AMEL Y (Salvador 2008).

La amelogenina ha sido secuenciada totalmente en su composición de aminoácidos por Fichmany colaboradores en 1991, analizaron por electroforesis extractos de la proteína y encontraron que existía una diferencia en los componentes de ésta dependiendo del sexo del individuo de donde se tomaba la muestra.

2.12 Identificación de oligonucleótidos en las bases de datos para la determinación del sexo en PCR punto final

El gen Amelogenina se localiza en los dos cromosomas sexuales de ovejas y ciervos (Pfeiffer y Liss, 2006), abarca una región pseudoautosómica en diversas especies de mamíferos. Es por esto que la diferencia que existe en longitud de la secuencia entre los genes AMEL X-Y, específicos en las diferentes especies, hace que este gen pueda identificar los cromosomas, así mismo los homólogos de X y Y del gen (AMELX y AMELY), pueden ser apropiados para la determinación del sexo en una evaluación molecular. Siguiendo una sola técnica de PCR con un solo par de cebadores masculinos específicos (Iwase *et al.*, 2003).

Para poder expresar este gen se extrajo ADN genómico a partir de sangre en nueve especies salvajes y domésticas como son: ganado doméstico Europeos (*Bos taurus*), Banteng (*Bos javanicus*), Gaur (*Bos Frontalis*) Europeo bisonte (*Bison bonasus*) Bufalo de agua (*Bubalus arnee*), Bufalo Africano (*Syncerus caffer*), y Anoa (*Bubalus de pressicornis*) de la tribu Bovini Subfamilia Bovina, así como la Oveja doméstica (*Ovis aries*) y Caprino (*Capra hircus*) que pertenece la tribu capri de la Subfamilia caprinos, además de cerdos y caballos. La técnica de PCR de amelogenina se amplificaron con un volumen final de 10 µL que contenían 40 ng de ADN genómico, dNTP 200 Mm, 0,15 unidades de Taq ADN polimerasa (Promega, Mannheim, Alemania) 10 molP de cada muestra. (Forward **5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3'**)

(Revers **5'-CCGCTTGGCTTGTCTGTTGC-3'**) (Ennis y Gallagher, 1994). Las muestras fueron sometidas en los siguientes ciclos: desnaturalización 3 min. A 94 °C, 35 ciclos, que constan de 30 seg de desnaturalización a 95 °C, 1 min. De recocido, a 60 °C y 30 seg a la extensión 72 °C y una etapa final de elongación durante 7 min a 72 °C. Los productos de PCR, fueron separados por electroforesis, al 3 % de agarosa, se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Las secuencias han sido puestas en Gen Bank (DQ469588-DQ469605).

La amplificación de AMELX y AMELY secuencias de ovino y caprinos revelaron los siguientes amplicones de 262 y 202 Pb. Respectivamente (Rosemarie y Kuhn, 2006).

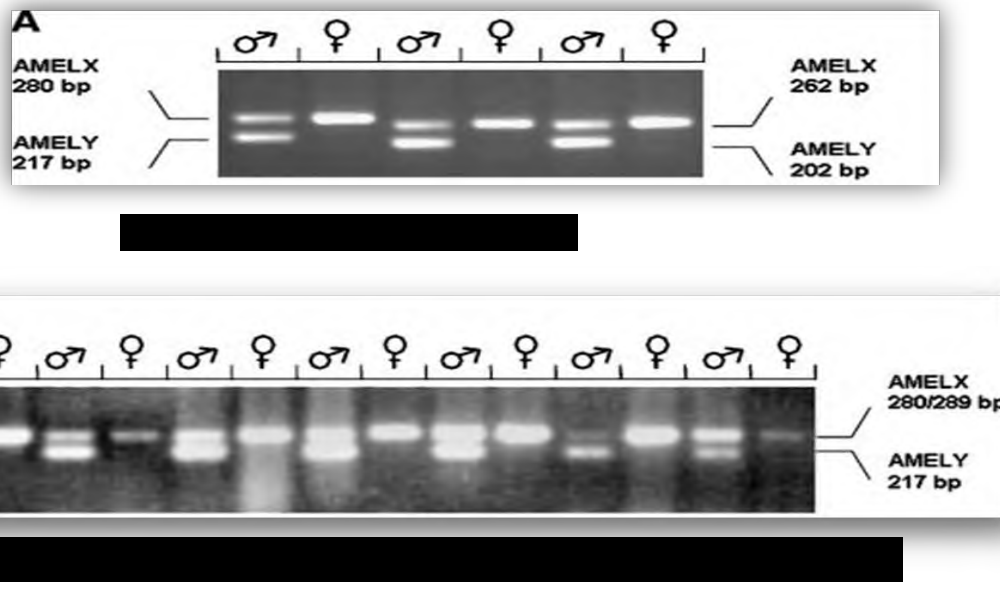


Figura 3. La determinación del sexo basado en el gen AMELY, amplificación (AMELX – AMELY), en macho y hembra, para especies salvajes y domésticos. (Art. Amelogenin Amplification in Bovidae R. Weikard *et al*) (imagen modificado por MCA)

3. HIPÓTESIS

Los espermatozoides portadores del cromosoma "Y" tienen mayor movilidad por lo que podrán penetrar la fracción de mayor concentración de albúmina sérica humana logrando con ello su separación.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Separar espermatozoides “Y” provenientes de eyaculados ovinos mediante gradientes de densidad de albúmina sérica humana.

4.2. Objetivos específicos

a). - Evaluar la motilidad y concentración de espermatozoides portadores del cromosoma “Y” provenientes de semen fresco y diluido a través de gradientes de concentración al 10, 15 y 10 % de albúmina sérica humana.

b). - Determinar las diferentes proporciones de espermatozoides “X” y “Y” obtenidas de las columnas mediante la técnica de PCR punto final.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Ubicación

El presente experimento se realizó en el laboratorio de Biotecnología animal perteneciente, a la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, lo cual se localiza en el Circuito Central No 200, Col. Parque Industrial C.P.68301.

5.2 Eyaculados

Se utilizaron un total de 40 eyaculados, provenientes sementales de la raza Katahdin. El criterio de inclusión para cada muestra consistió en cumplir con una motilidad entre el 70-90 %. Se agruparon en SSD (semen sin diluir) (n=10) semen puro y SD (semen diluido) (n=10); por lo tanto, cada muestra se evaluó mediante tres gradientes: 10, 15 y 20 % con HSA.

5.3 Obtención de eyaculados

Los eyaculados se recolectaron con vagina artificial a una temperatura promedio entre 37-45 °C. Una vez obtenidos los eyaculados se evaluaron los siguientes parámetros: volumen, color, motilidad y concentración espermática.

5.4. Dilución del espermatozoide

Se elaboró el diluyente con base de yema líquida de huevo 2.5 ml, al cual se agregó 2.37 g citrato de sodio (Golden Bell) y 0.80 g de glucosa (Sigma Aldrich) ésta mezcla se diluyó en 100 mL de solución salina al 0.9 % (C.S PISA). Finalmente, la solución se filtró e incubó a una temperatura de 37 °C.

5.5 Preparación de las columnas

Una vez realizada la evaluación espermática del semen se prepararon las columnas de albúmina en tubos colectores cónicos. A partir de una solución stock de HSA al 25 %, se realizaron las diluciones con solución salina al 0.9 % para obtener tres concentraciones 10, 15 y 20 % de HSA, las cuales fueron incubadas a 37 °C, para atemperarlas y evitar muerte de los espermatozoides por cambios bruscos de temperatura. Las columnas fueron montadas añadiendo 1 mL de HSA de cada una de las concentraciones al 20, 15 y 10 % respectivamente en el tubo colector, al formarse los 3 gradientes se agregó el semen puro o diluido (según fuera el caso). El tubo se cubrió con aluminio y se incubó a 37 °C durante 1 h

5.6 Separación de columnas

Al finalizar la incubación se realizó la separación de las fracciones del 10, 15 y 20 % de las columnas con un intervalo de tiempo de 10 min respectivamente. Posteriormente se evaluó la motilidad (lente de fase 10X negativo) y concentración

espermática (lente de fase 10X positivo) usando el microscopio óptico UB203i con la cámara Neubauer en el sistema de análisis espermático por computador (CASA).

5.7 Evaluaciones espermáticas

5.7.1 Motilidad espermática pre y post separación

Se evaluó la motilidad espermática pre y post proceso de separación. En un portaobjeto se colocó un volumen de 5 μ L de cada muestra por cada una de las concentraciones por columna, las cuales fueron observadas a un objetivo 10 X de fase negativa. Se adquirieron cuatro campos por minuto permitiendo capturar al menos 4,685 células espermáticas en cada análisis.

5.7.2 Concentración espermática pre y post separación.

La concentración espermática se realizó una dilución 1:200 (semen: agua destilada) en cámara de Neubauer. Se observó en el microscopio con el objetivo 10X de fase positivo.

5.8. Prelavado de las muestras separadas por columnas de albúmina

Para obtener un ADN con buena integridad, calidad y concentración del semen, se realizó un prelavado antes de la extracción de ADN genómico, a 100 μ L de muestra seminal, se añadieron 500 μ L de etanol al 70 %, los cuales fueron mezclados y

centrifugados por 5 min a 15,500 x g. Se eliminó el sobrenadante y se repitió dos veces este lavado. Finalmente se agregó 500 µL de tampón lisis, 21 µL de 1 M DTT (ditiotreitól) (sigma) y 20 µL (20 mg/mL) de proteínasa K (Zymo Research) a los espermatozoides.

5.9 Técnica de extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit Quick-DNA™ Universal (Zymo Research) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Al término del proceso de extracción el ADN las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Para verificar el correcto estado del ADN genómico y su concentración se realizó un corrimiento electroforético en gel al 1.5 % de agarosa.

5.10 Identificación de los cromosomas Y, por PCR, en las columnas de albúmina del 10,15, y 20 %

Para identificar el repertorio de espermatozoides Y, se realizó la amplificación específica del gen que codifica la proteína Amelogenina mediante la técnica de PCR. Todas las muestras se amplificaron utilizando el kit Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se utilizaron los cebadores Forward 5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3' y Reverse 5'-CCCGCTTGGCTTGTCTGTTGC-3' reportados en la base de datos de Gen Bank con números (DQ469588-DQ469605). Cada corrida se estableció con la presencia de dos

controles positivos, dos negativos y cada muestra de semen de acuerdo al gradiente por duplicado, y un marcador de peso molecular de 50 pb (Thermo scientific). Las PCRs se realizaron en un Termociclador (TC-512, TECHNE). Los productos obtenidos de la PCR fueron separados por la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 3 % y se revelaron mediante tinción con bromuro de etidio.

5.11. Análisis estadístico

Todos los datos de Concentración, motilidad y vitalidad se analizaron mediante un ANOVA de medias repetidas, se les aplicó la prueba de medias de Tukey con el programa estadístico SPSS para Windows.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Motilidad, concentración y vitalidad.

Las características iniciales de cada eyaculado se presentan en la Tabla 2, en la cual se muestran los valores promedio de volumen, pH, concentración inicial y motilidad de los eyaculados utilizados para ser sometidos a las columnas de HSA.

Tabla 2. Número de eyaculados, valores promedio de volumen, pH y concentración Inicial

Parámetro	Valor
Numero de eyaculados	40
Volumen (mL)	1.16 ± 0.34
pH	6.73 ± 0.25
Concentración inicial (x 10 ⁹ esp/mL)	3.54 ± 0.53
Motilidad Inicial	75 %

Los resultados de motilidad espermática antes (inicial) y después (final) de ser sometidos al proceso de separación a través de los gradientes de HSA se muestran en la Tabla 3. En la cual se observa que existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre

los gradientes para dicha variable entre los tratamientos SSD y SD respectivamente. Sin embargo, el gradiente final (20 % HSA) no muestra diferencia significativa entre el valor inicial de motilidad para ninguno de los tratamientos.

Tabla 3. Valores de motilidad de semen ovino puro y diluido, de cada uno de los gradientes de HSA.

Tipo de Semen	Motilidad			
	Inicial	HSA 10 %	HSA 15 %	HSA 20 %
SSD	88.00 ± 2.10 ^a	70.20 ± 0.90 ^b	81.12 ± 1.67 ^c	83.15 ± 1.56 ^a
SD	86.00 ± 2.10 ^a	69.00 ± 1.99 ^b	80.20 ± 2.45 ^c	84.20 ± 0.70 ^a

SSD: Semen sexado sin diluir, **SD:** Semen sexado diluido.

Literales (a, b, c,) entre hileras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$)

Las concentraciones espermáticas de los diferentes gradientes se muestran en la Tabla 4. En la cual se observa que existe una diferencia ($P \leq 0.05$) en cuanto a la concentración de acuerdo con el gradiente de HSA y al tipo de semen. Siendo el gradiente del 10 % quien presenta aproximadamente un 43 % de la población total de los espermatozoides en el tratamiento SSD, en el caso del gradiente del 20 % de HSA del tratamiento SD mostro un 53 % de la población espermática, la columna del 15 % de HSA tanto para el tratamiento SSD y SD dio un 29 y 28 % de la población total de

los espermatozoides respectivamente, no mostrando diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre el tipo de semen.

Tabla 4. Concentración en los diferentes gradientes de concentración de HSA de Semen puro y diluido.

Tipo de Semen	Concentración espermática ($\times 10^6$)		
	HSA 10 %	HSA 15 %	HSA 20 %
SSD	141.0 \pm 1.86 ^{aA}	87.0 \pm 2.52 ^{bA}	72.0 \pm 2.21 ^{cA}
SD	159.0 \pm 2.04 ^{cB}	84.0 \pm 1.86 ^{bA}	57.0 \pm 2.39 ^{cB}

SSD: Semen sexado sin diluir, **SD:** Semen sexado diluido.

Literales diferentes (Aa, bA, cA, cB, bA y cB) entre hileras y columnas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$)

Los valores promedio correspondientes al parámetro de vitalidad para las muestras de semen sometido a gradientes de concentración diluida y sin diluir del gradiente del 20 % de HSA, así como el control se muestran en la Tabla 5. Se encontró un aumento significativo en la vitalidad ($P \leq 0.05$) en los valores obtenidos entre los grupos de semen sexado con respecto al semen sin sexar, sin embargo, para el semen sexado no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre tratamientos

Tabla 5. Porcentajes de vitalidad de espermatozoides provenientes del gradiente 20 % de HSA.

Tipo de Semen	Vitalidad (%)
SFSS	83.10 ± 1.75 ^b
SSD	90.15 ± 1.10 ^a
SD	89.7 ± 2.35 ^a

SFSS: Semen fresco sin someter a columnas, **SSD:** Semen sexado sin diluir, **SD:** Semen sexado diluido. Literales (a, b, c) diferentes entre columnas indican diferencia significativa entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

6.2. Extracción de ADN

El fluido seminal, también llamado plasma seminal es importante para la sobrevivencia de los espermatozoides, pero puede disminuir la pureza y por lo tanto la calidad del ADN debido a su contenido de fructosa y proteínas. Los espermias por sí mismo están protegidos por una membrana rica en enlaces disulfuro, que impiden la lisis celular y por lo tanto dificultan el aislamiento de ADN, de esta forma se realizó un método de lavado para romper los enlaces de disulfuros, y así se logró obtener los resultados favorables, en la (Figura 4), mediante el cual se observa una mayor cantidad y calidad de ADN en las muestras que fueron sometidas a un lavado mientras que en las muestras sin lavar presentan un barrido (Carriles 1 y 2), en el cual probable el ADN

presenta una degradación, los carriles 3, 4, 5 no presentan ninguna expresión, En la (figura 5) se presentan las muestras de ADN con prelavado, en semen diluido y con semen puro, obteniendo que tienen una mejor integridad y que se encuentran en buen estado para poder realizar los productos de PCR.



Figura 4. ADN genómico de controles positivos y muestras de columnas, sin prelavado, con prelavado. El carril 1 y 2, ADN genómico de semen puro, con un buffer de carga de 2 μ L, el carril 3, ADN genómico de la muestra al 10 % con HSA, carril 4 ADN genómico al 15 % con HSA, carril 5 ADN genómico al 20 % HSA, con un buffer de carga de 3 μ L. y los carriles 6 ,7 ,8 ,9, 10, son la misma muestra del lado izquierdo, con el proceso del pre lavado, con un buffer de carga de 2 μ L.

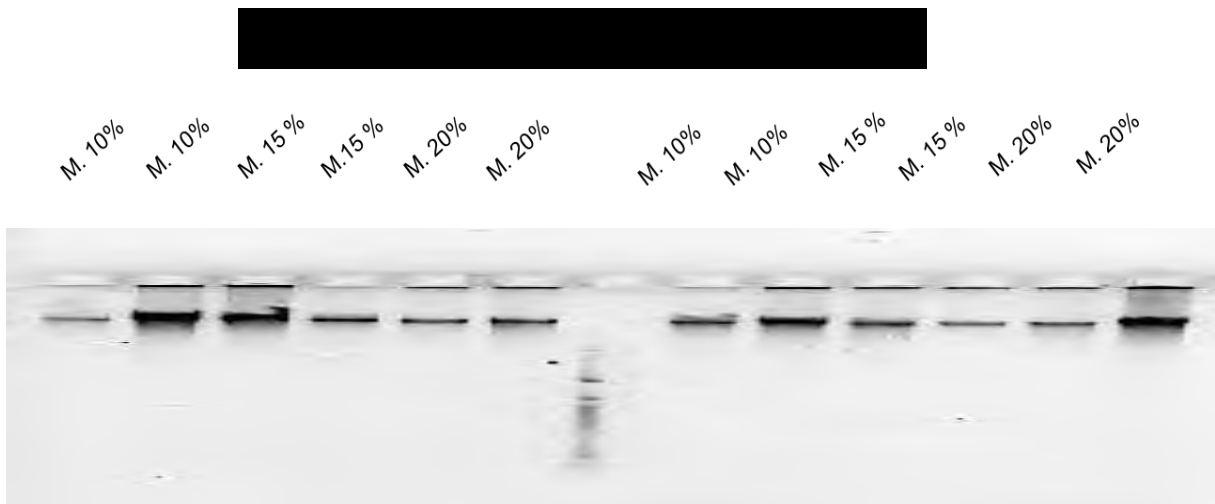


Figura 5. ADN genómico obtenido a partir de espermatozoides sometidos a columnas de albúmina sérica. Carriles 1 y 2: muestras de HSA al 10 %, carriles 3 y 4: muestras al 15 % con HSA, carriles 5 y 6: son muestras de HSA al 20 %, preparadas con semen diluido, carriles 7 y 8: muestras de HSA al 10 %, en los carriles 9 y 10: muestras al 15 % con HSA, en los carriles 11 y 12 son muestras con HSA al 20 %, preparadas con semen sin diluir, todas la muestras con buffer de carga de 2 μ L.

6.3 Verificación por PCR

Los productos de PCR para el ADN genómico de los espermatozoides sometidos a los diferentes gradientes de HSA de los tratamientos SSD y SD, se muestran en la Figura 6. Los cuales fueron observados en geles de agarosa al 3 %, identificando el gen Amelogenina, al comparar las muestras provenientes del gradiente de concentración del 20 % HSA contra el control positivo se observa un mismo tamaño de banda, por lo cual se infiere una mayor concentración de espermatozoides portadores del cromosoma “Y” en dicho gradiente, siendo igual al control positivo, dicha expresión es igual para los tratamientos SSD y SD.

MPM **C -** **C+M** **C+F** **M10 %(2X)** **M15 %(2X)** **M 20 %(2X)** **MPM**

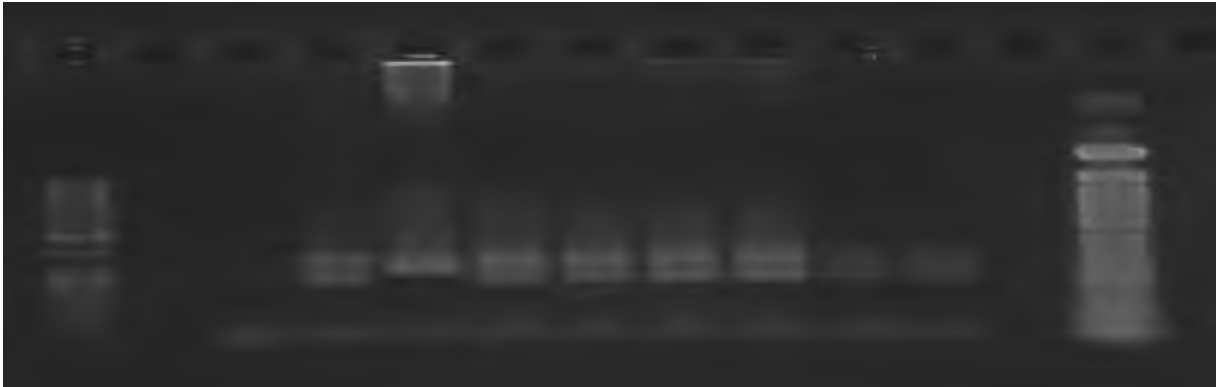


Figura 6. Identificación de los espermatozoides “Y” por la técnica de PCR. El carril 1 es el marcador de 50 pb. Carril 3: control negativo más agua, carril 4 es control positivo con ADN genómico de semen puro, carril 5 es el control positivo de ADN genómico con sangre de hembra de ovino, carriles 6, 7 (SSD) con HSA al 10 %, 8,9 al 15 % y 10, 11, 20 %, y en el carril 13 marcador 50 pb, todas las muestras se cargaron con un buffer de 5 μ L.

7. DISCUSIÓN

7.1. Valores generales

El volumen promedio de los eyaculados se encuentra dentro de los rangos descritos para ovinos de pelo 0.5 y 2 mL propuesto por Gil *et al.*, (2002). El volumen promedio del semen en el presente estudio es similar a lo reportado por Ake *et al.* (2017) quien obtuvo un volumen promedio de eyaculado de 1.03 mL en sementales de la misma raza mientras que en este estudio el volumen promedio fue de 1.16 mL. El pH obtenido en todas las muestras estuvo dentro de lo normal según lo logrado por Aisen, (2004), los valores reportados en ovinos de se considera un pH normal, entre 6.2 y 6.8 (Ascue, 1985).

La media de la concentración espermática fue mayor a la reportada por Guillén, (2001), quien obtuvo una media de 3140×10^6 esp/mL; pero menor a la reportada por (Evans y Maxwell 1990), quien obtuvo valores entre 3900×10^6 y 6000×10^6 esp/mL. La concentración espermática por mL de eyaculado varía de acuerdo con la actividad sexual del macho, el rango aceptable es de 2.5×10^9 esp/mL (Gil *et al.*, 2000).

7.2. Motilidad espermática

Estudios de motilidad en semen sexado de ovino mediante la técnica columnas de albúmina no han sido realizados; por lo que los resultados fueron comparados con de otras especies.

Hernández *et al.*, (2008) en un estudio realizado en conejos reporta motilidades de 60, 45 y 35 % en espermatozoides contenidos en las fracciones de HSA al 10, 15 y 20 %, respectivamente. Estos porcentajes indican que a medida que incrementa la concentración de HSA la motilidad es menor, resultados que difieren a los obtenidos en el presente trabajo; sin embargo, esto se atribuye a que las células espermáticas de conejo no se lavaron antes de evaluar la motilidad. Los porcentajes de motilidad en las fracciones 10, 15 y 20 % son inferiores a los mencionados en humanos por Ericsson *et al.*, (1973) quienes utilizaron fracciones con albúmina sérica bovina (BSA) al 6, 10 y 20 %, y reportan una motilidad de 91, 75 y 95 %, respectivamente. Por su parte Beernink *et al.*, (1993) al utilizar fracciones de HSA al 7.5, 12.5 y 20 % encontraron porcentajes de motilidad que oscilaron entre 80 y 86 %.

De igual manera David *et al.*, (1977) reportan un incremento en este parámetro al aumentar la concentración de ASB (Albumina Sérica Bovina) en el gradiente utilizado en metodologías de una sola migración pasando de motilidades del 60 % en gradientes del 10 % a un 95 % de motilidad en gradientes del 25 %. Beal *et al.*, (1984) obtuvieron 35 % en muestras no tratadas en comparación con 60% en muestras procesadas con ASB en muestras congeladas. Por otro lado, Chen *et al.*, (1997) en muestras seminales humanas se reportan valores de 99.3 % de motilidad pos tratamiento a ser sometidas a gradientes de HSA, mientras que Samardzija *et al.*, (2006) obtuvieron 70 % de motilidad en las muestras tratadas de bovino SBA.

7.3. Concentración espermática

La concentración espermática fue diferente ($P < 0.05$) entre las fracciones 10, 15 y 20 % debido a que en la columna de HSA la concentración espermática de la muestra inicial de semen fue de 300×10^6 , la cual se mantiene la proporción de que todos aquellos espermatozoides con inmadurez y que no cuentan con movimiento oscilante de la cola para desplazarse o muertos, no pueden atravesar los gradientes.

La manera en cómo se distribuyen los espermatozoides en las fracciones de HSA al 10, 15 y 20 % respectivamente para cada uno de los tratamientos (SSD: 47, 29 y 24 %; SD: 53, 28 y 19 %) es similar a la distribución observada por Flores *et al.*, (2010); quienes reportan 67, 18 y 15 % de espermatozoides de conejo en las fracciones residual del 12.5 y 17.5 % de HSA respectivamente. Hernández *et al.*, (2008) en un estudio realizados en conejos encontraron 46, 34 y 38 % de espermatozoides en las fracciones de 10, 15 y 20 % de HSA respectivamente; se puede observar que a medida que se incrementa la concentración de las fracciones de HSA disminuye la concentración espermática, lo cual coincide con los resultados encontrados en este trabajo. El comportamiento de cómo se distribuye la concentración espermática permite inferir que sólo pocos espermatozoides son capaces de atravesar fracciones de HSA a una alta concentración (19 o 24 %), ayudados por su peso o su facilidad de movimiento (Muster *et al.*, 1999).

7.4. Vitalidad

En el presente estudio la vitalidad presenta diferencias significativas ($P < 0.05$) al comparar los gradientes del 20 % de HSA de los tratamientos SSD y SD, contra el semen sin sexar, sin embargo, los valores de vitalidad del tratamiento SD concuerdan a lo reportado por Hernández *et al.*, (2008) quien reportan una vitalidad del 83 % en fracciones del 20 % de HSA en semen de conejo, incluso siendo superiores a los reportados por Ozturkler *et al.*, (2000), quien reporta un 77.45 % de espermatozoides vivos en semen fresco. Por su parte Aguado *et al.*, (1998) reporta un 55.6 % de vitalidad en espermatozoides ovinos de la raza Manchenga, pero menor a los obtenidos por Santiani *et al.*, (2004) y Ávila, (2009), quienes obtuvieron valores de 97.7 y 86 %, respectivamente en semen fresco.

La técnica mejora la calidad de las preparaciones seminales a utilizarse en las biotecnologías reproductivas ya que permite separar a los espermatozoides con morfología normal y ADN intacto de la población total; además, remueve debris celular, especies reactivas de oxígeno, patógenos, etc. (Martí *et al.* 2006). El presente estudio ha demostrado que las muestras seminales obtenidas en sementales ovinos no presentan variación de los parámetros seminales más importantes cuando estas han sido tratadas por la técnica de gradiente de densidad.

7.5. Verificación por PCR

El semen sexado ha traído una revolución a la industria pecuaria (Seidel, 2003) debido a las desventajas biológicas y económicas de la citometría de flujo, se han realizado esfuerzos para desarrollar métodos de sexado de espermatozoides basados en la densidad y la motilidad de los espermatozoides portadores del cromosoma X y Y. Entre estos, el método de migración modificado es capaz de separar los espermatozoides portadores del cromosoma X y Y, como portador del cromosoma X los espermatozoides tienen más contenido de ADN que los espermatozoides que portan el cromosoma Y, lo que resulta en una migración de más rápida velocidad del espermatozoides portador del cromosoma Y. que el espermatozoide portador del cromosoma X. (Azizeddin *et al.*, 2014).

En este estudio, se implementó una técnica e PCR como método de verificación de la concentración de la proporción de espermatozoides Y en muestras de semen ovino, aunque con la limitante de no poder determinar qué porcentaje se encuentran presentes la concentración de espermatozoides Y. Sin embargo, aunque el estudio de semen sexado a través de gradientes y verificado a través de la técnica PCR punto final son limitados.

Estudios similares reportan una desviación hacia un cromosoma en específico cuando son verificados mediante la técnica de qPCR, como el realizado por Sureka *et al.*, (2013) quienes seleccionaron espermatozoides portadores del cromosoma Y en cabras Sannen y Jamnapari mediante un método de gradiente de sacarosa al 1 %,

logrando separar aproximadamente el 62.6 % en Jamnapari y el 59.0% en Sannen para el cromosoma Y. Por su parte Chandler *et al.*, (1998) reportan una amplia variación (24-84 %) del porcentaje de del cromosoma Y mediante un método de gradientes y verificado en un método semicuantitativo de PCR. Por su parte, Asma *et al.*, (2017) al realizar separación de espermatozoides bufalinos bajo el método de swing up modificado, informa que dicho método permite la obtención de una mayor proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X cuando se utilizan gradientes a baja concentración y un mayor número de espermatozoides portadores del cromosoma Y cuando se utilizan gradientes en altas concentraciones, dicho método no compromete la calidad del semen después del descongelamiento.

Estudios realizados a nivel práctico como el realizado por Hernández *et al.*, (2008) quien inseminó conejas con semen sexado en gradientes de HSA obtuvieron un 72.2 % de machos en comparación de un 27.8 % de gazapos hembras, concluyendo que la técnica de preselección del sexo mediante gradientes de densidad de HSA es adecuada para seleccionar espermatozoides con cromosoma Y de eyaculados de conejo y producir más machos en la camada, en este mismo sentido estudios realizados en humanos sugieren que aproximadamente el 75 % de los descendientes obtenidos de este método son varones (Beckett *et al.* 1989), como el realizado por Flaherty *et al.*, (1997) quienes mediante el método de gradientes para separación espermática obtuvieron una desviación del 23 % hacia el sexo masculino. Sin embargo, Beernink *et al.*, (1993) informó subsecuentemente 43 % de espermatozoides Y en muestras tratadas con gradiente de albúmina y 50 % de esperma Y en muestras no tratadas. Ueda y Yanagimachi, (1987), encontraron un promedio de 48 % de

espermatozoides Y en las muestras tratadas, y esto no fue diferente de las muestras de control no tratadas. Beal *et al.*, (1984) obtuvieron 45 % de machos de inseminaciones con semen tratado con gradiente de albúmina y 54 % de machos de inseminaciones con semen control; estos resultados se confirmaron usando un citómetro de flujo y concluyeron que las muestras tratadas no estaban enriquecidas con esperma Y. Sauer *et al.*, (2012) sugirió que el procedimiento de Ericsson podría no producir una muestra enriquecida con espermatozoides Y, sino que podría alterar diferencialmente alguna naturaleza de los espermatozoides Y o X, de tal manera que hay una mayor inclinación para que los espermatozoides Y fertilicen los ovocitos. Los resultados de sexado por análisis de PCR no arrojan resultados contundentes que demuestre en que porcentaje se pueden separar los espermatozoides Y por gradientes de HSA.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados en el presente trabajo demuestran que la técnica de gradiente de densidad permite seleccionar subpoblaciones de espermatozoides con valores similares de los parámetros microscópicos comparados con muestras no tratadas.

Los resultados de PCR muestran que únicamente en el gradiente al 20 %, se concentra la mayor cantidad de espermatozoides con el cromosoma Y. por lo que se requieren seguir implementando estrategias para verificar el porcentaje de separación de los espermatozoides sometidos a gradientes de HSA.

9. PERSPECTIVAS

Se requiere la implementación de técnica de qPCR, que permitan verificar con precisión los cromosomas X y Y de espermatozoides en diferentes poblaciones cuando estos son sometidos a gradientes para su separación.

Realizar estudios de fertilidad a nivel de campo para poder evaluar si con el semen tratado mediante el gradiente de densidad, se obtienen dichas desviaciones y se mejoran las tasas de preñez y si los resultados es iguales o mejores que utilizando semen sexado por citometría de flujo

10. LITERATURA CITADA

Alvarez H. 2000. Effect of trehalosa and E.D.T.A on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53: 1053-61.

Atto M. 2007. Importancia de los ovinos tropicales introducidos al país: características productivas y reproductivas. 23: 20-25.

Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos. Blackbelly.
<http://www.asmexcriadoresdeovinos.org> 2007.

Avendaño RL., Álvarez LM., Saucedo JS., Correa A. 2004. Engorda de corderos Pelibuey y sus cruizas con Dorper y Katahdin bajo condiciones de estrés calórico. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatría, Michoacán, México, 10 -13

Ascue RS. 1985. Espermatoograma en carneros reproductores de diferentes edades en la zona altoandina – Pasco, Perú (tesis de Licenciatura). Facultad de Biología. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Pasco, Perú.

Ake-López JR, Aké-Villanueva JR., Segura-Correa JC., Magaña-Monforte G. 2017. Evaluación reproductiva de ovinos de pelo bajo condiciones de trópico. XLIV Reunión Científica AMPA, Clima y Ganadería: Productividad Sustentable. Chiapas. 740-744.

Aisen EG. 2004. Reproducción Ovina y Caprina, 1ed. Intermedica, Buenos Aires. 216.

Ascue RS. 1985. Espermatograma en carneros reproductores de diferentes edades en la zona al toandina - Paseo, Perú. Tesis UNDAC. Paseo, Perú.

Ávila Anglas M. Efecto de dos dilutores en la conservación de la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides en semen refrigerado de carnero (tesis de Licenciatura). Banco Nacional de Semen - Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 2009.

Aguado MJ, García-Cervigón M, Manso A, Pérez-Guzmán MD, Garde J, Montoro V. Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino Manchengo mantenido durante 24 horas en refrigeración. En: XXIII Jornadas Científicas de la SEOC. Vitoria; 1998. 521 - 524.

Asma-ul HM Abid M., Tasawar S., Muhammad S., Bushra AR. 2017 Spermsexing in Nili Ravi buffalo through modified swim up: Validation using SYBR® green realTime PCR. Animal Reproduction Science 182: 69-76.

Beernink, F.J., Dmowski, W.P. and Ericsson, R.J. 1993 Sex preselection through albumin separation of sperm. Fertil. Steril., 59, 382–486.

Banks S., King SA., Irvine DS. Saunders PT. 2005. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*. 129:505-14.

Buitrago PJ., Pérez SLM. 2008. Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino. Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria. Bogotá.

Burke JM., JK Apple. 2007. Growth performance and carcass traits of forage- fed hair sheep wethers *Small Ruminant Res* 67: 264-270.

Beernink FJ., and Ericsson RJ. 1984. Male sex preselection through sperm Isolation. *Fertility and Sterility* 38: 493-495.

Bustin SA. 2005. Real-Time PCR. En *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and proteomics* (J. Fuchs, M. Podda, eds.). New York: Marcel Dekker, 1117 – 1125.

Blondin P., M Beaulieu. V Fournier., N Morin., L Crawford., P. Madan., and W.A King. 2009. Analysis of sorting to the embryo. *Theriogenology* 71: 30- 38.

Beernink FJ. Dmowski WP., and Ericsson RJ. 1993. Sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertil. Steril.*, 59: 382–386.

Be WE, White LM., Garner DL. 1984. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient. J Animal Science 58: 1432-1436.

Brass, K.; Palma, G. 2008. Inseminación artificial en la especie equina. En: Palma, G. Biotecnología de la Reproducción. Mar del Plata, Reproducción Biotecnología, 2ª edición, 547- 87.

Beal WE, White LM, Garner DL. 1984. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient. J Anim Sci 58: 1432-1436.

Beckett, TA; Martin, RM; HOAR, DI. 1989. Assessment of the sephadex technique for selection of X-bearing human sperm by analysis of sperm chromosomes, deoxyribonucleic acid and Y-bodies. Fertil. Steril. 52: 829-835

Beernink FJ., Dmowski WP., Ericsson RJ. 1993. Sex preselection through albumin separation of sperm. Fertil. Steril. 59(2): 382-386

Cran DG., Johnson, and Polge CE. 1995. Sex preselection in cattle a field trial. Veterinary Record 136:495-496.

Cran DG., Johnson LA., Miller NG., Cochrane D & Polge C. 1993. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilisation. *Veterinary Record* 132: 40–41.

Cseh S., Polichronopoulos T., Soltin L. 2004. Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis *Reproduction fertility, dev.*16 :128 -129.

Copello MJ. 2011. Semen sexado en conejos: efecto de tratamientos de Swim-up y Percoll en la tasa de nacimientos de machos y hembras [en línea]. Trabajo Final. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina

Chen M., Guu H., Ho ES. 1997. Efficiency of sex pre-selection of spermatozoa by albumin separation method evaluated by double-labelled fluorescence in situ hybridization. *Hum Reproduction* 12: 1920-1926. doi: 10.1093/humrep/12.9.1920.

Chandler JE., HC. Steinholt-Chenevert., RW. 1998. Adkinson and E.B. Moser Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by polymerase chain reaction, calving, and farrowing records *J Dairy Sci* 81:1855-1867

David G., Jeulin C., Boyce A., Schwartz D. 1977. Motility and percentage of Y and YY-bearing spermatozoa in human semen samples after passage through bovine serum albumin. *J Reproduction Fertility* 50: 377-379

De Vries AM., Overton JF., K. Leslie., S.Eicker., and G. Rogers. 2008. Exploring the impact of sexad semen on the Structure of the dary Industry. *Journal of Dairy Science* 91: 847-856.

Did. Sheep production Handbook American. 2002. Sheep Industry Ine.bCentinnial Co. Edition (7): 254: 22-25.

Dundass N., Leos NL., MPR., y BB. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleica cid extraction methods with manual extraction. *Journal of molecular Diagnostic* 10:311-316.

Donovan A., Hanrahan J., Lally T. 2001. AI for sheep using frozen-thawed semen. *Teagasc*. 4047: 48

Ericsson RJ., Langevin CN., Nishino M. 1973. *Th* Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature*. 246: 421-424.

Evans, G. y Maxwell, W.M.C. 1990. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Buterworths Pty. Limited, Sydney, Australia.

Flaherty SP., Matthews CD.1996. Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Molecular Human Reproduction* 12,(2): 937-942.

Flaherty SP., Michalowska J., Swann NJ., Dmowski WP., Matthews CD., Aitken RJ. 1997. Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa. *Hum Reprod* 12: 938-942.

Faber DC., Molina JA., Ohlrichs CL., Vander ZDF., y Ferré LB. 2003. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, 59(1): 125–138.

Flores M., P S., R. Rangel S., C A Apodaca S., y J. Ayala O. 2007. Sexado de semen ovino utilizando la técnica columnas de albúmina para obtener hembras. In: *Memorias de la XVII Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Cálidos*. 18 al 19 de octubre. Mexicali, Baja California, México. : 395-397.

Finchmany AG., Bessem, C.C., lau, E.C., Pavlova, Z., Shuler, C., Slavkin, H.C. and Snead, M.L. (1991). Human developing enamel proteins exhibit a sexlinked dimorphism. *Calcif. Tissue Int*, 48: 288-290.

Flores PSM., P Cortés V., E. Arenas R., Ambriz DRG., R. Rodríguez de L., y Rangel RS. 2010. Estudio de la movilidad espermática en semen fraccionado por columnas de albúmina, como propuesta para selección de sexo. *In: Memorias del VIII Encuentro Nacional de Cunicultura*. Pachuca, Hidalgo, México. 73-77.

Ferré L and Cattaneo L. 2013. Biotecnología reproductiva: producción in vitro de embriones y semen sexado. *13:245*.

Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm, *Theriogenology*. 65: 943-957.

Garner DL., Háflez ESE. 2002. Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háflez ESE. and Háflez B (eds)., *Reproduction in farm animals*, 7 th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, 96-109.

Gibbons A., Cueto M., Wolff M., Arrigo JGJ. 2004. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Comunicación técnica PA 200. INTA. E.E.A Bariloche, Chile. 54.

Gil J., y Olivera J. 2004. Preservación de semen de carnero a 5° C: resultados con diferentes diluyentes para la IA en majadas del Proyecto Merino Fino. Serie de Actividades de Difusión INIA Tacuarembó. 392: 10-8.

Gil J, Rodriguez-Irazoqui M, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. 2002. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*. 57(7):1781-1792.

Gil J., Söderquist L. y Rodriguez-Martínez., H. 2000. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*. 54, 93-108.

- Graham J. 2001. Assessment of sperm quality. 47th Annu José A. Atto Mendives. 2007. Importancia de los ovinos tropicales introducidos al país: características productivas y reproductivas. 34: 14-16.
- Graham J., y Mocé E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology. 64: 492-504.
- Galina Carlos *et. al.* 2006. Reproducción de los Animales domésticos. Editorial Limusa. 381. 3a.ed. mexico Limusa S.A DE C.V.
- Gordon M. 1957. Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa. Production National Academi Sience. 43: 913-918.
- González-Garduño R, G Torres-Hernández, J Arece-García. 2010. Comportamiento productivo y reproductivo de ovinos Pelibuey en un sistema de pariciones aceleradas con tres épocas de empadre al año. *Zoot Trop* 28, 51-56.
- Guillén H. 2001. Evaluación de las características seminales en carneros Blackbelly (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Guevara SL. 2003. Tesis. Análisis de perfiles genéticos en delitos sexuales como herramienta de identificación.

Hernández PJE., Fernández CJ., Reyes CJ., Cerezo PG., Echegaray JL., Mendoza, B. 2008. Separación de espermatozoides “Y” de eyaculado de conejo por medio de gradientes de densidad de albúmina sérica humana.. Revista de Salud Animal. (30): 1 :45-49.

Hafez ESE., Hafez B. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7 ed. Mc Graw Hill (ed.). México. 519.

Iwase M., Satta Y., Takahata N. 2003. Sex-Chromosomal Differentiation and Amelogenin Genes in Mammals. Department of Biosystems Science, Graduate University for Advanced Studies, Hayama, Kanagawa, Japan. 59

Jannet F. 2001. Semen Characteristics after Vasectomy in the Ram. Theriogenology. 56: 485-91.

Jiménez M., Puchades S., Moce E., Viudes-de-Castro., Vicente MP., JS and Rodríguez M. 2004. Use of Powdered Egg Yolk vs Fresh Egg Yolk for the cryopreservation of Ovine Semen. Reproduction Dom Anim 39, 438–441. Blackwell Verlag, Berlin.

Johnson LA., James PF., Harold WH. 1989. Sex preselection in Rabbits: Live Births from X and Y Sperm Separated by DNA and Cell Sortig. Biology of Reproductio 41:199-241.

Knobil E., Neil J. 2003. The physiology of reproductions. U.S.A. Second edition. 25:33.

Suanes GA. 2003. Analisis de perfiles genetics en delitos sexuales como herramientas de identification .41:67. Revista de Psiquiatría, Facultad de Medicina de Barcelona.

Lizuka KSA., Oki R., Kobayashi T. 1987. Sexing of human sperm by discontinuos Percoll density gradient and ist clinical application. Human Reproduction: 2,573-575.

López, A., Regueiro., M Castrillejos., A Pérez R. 1992. Morfología 68 espermática en carneros: efectos del plano nutricional y de la época del año. http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/171-espermatoca_15.pdf.

Lagally ET., Medintz I., Mathies RA. 2001. Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. Analytical Chemistry 73: 565-570.

Lau, E.G., Mohandas, T.K., Shapiro, L.J., Slavkin, H.C. and Snead, M.I (1989). Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. Genomics 4: 162-168.

Mackay IM., Arden KE., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids 30:1292-305.

Mc Donald SM y Burns D. 1978. Propiedades de los líquidos. In Físico para la Ciencias de la vida y de la salud. Fondo Educativo interamericano (ed.) 159-186.

Martí E., Pérez PR., Muiño BT., Cebrián Pérez JA. 2006. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. J Androl. 27 (6): 746 - 53.

Maxwell WM., Evans CG., Hollinshead FK., Bathgate R., Graaf SP., Eriksson BM., Gillian LKM Morton., and 'Brien JKO. 2004. Integration of Sperm. 32:56.

Macías CU. 2010. Crecimiento y características de canal en corderos Pelibuey puros y cruzados F1 con razas Dorper y Katahdin en confinamiento. Arch. med. Vet.[online].(42), n.3 [citado 2017-02-01]:147-154.

Mobini S., Heat A., and Pugh DG. 2002. Sheep and goat medicine, 1 ed. Saunders, Philadelphia, 186.

Méndez VG et al., 2009. Función reproductiva de sementales ovinos importados de Nueva Zelanda durante su primera época reproductiva en México. Vet. Méx [online]. (40), n.2 [citado 2016-10-10]:123-131.

Niemann H., Kuhla B., Flachowsky G. 2011. Perspectives for feed efficient animal production. Journal of Animal Science 89 4344–4363.

- Ollero M., Pérez PR., Gargallo IS., Morlanes JO., Muiño BT., and Cebrián PJ. 2000. Separation of ram spermatozoa bearing X and Y chromosome by centrifugal countercurrent distribution in an aqueous two-phase system. *Journal of Andrology* 21: 921-928.
- Olivera AJ. 2009. Manual de evaluación de semen en bovinos. Tesis presentada a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana, Región Veracruz.
- Ozawa M., Matsuzuka TM., Hirabayashi., Kanai Y. 2004. Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biological Reproduction*. 71:291-6.
- Perez PR. 2002. Prediction of fertility by centrifugal countercurrent distribution (CCCD) analysis: correlation between viability and heterogeneity of ram semen and field fertility. *Reproduction*. 123-869-75.
- Pfeiffer I., Brenig B. 2006. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Genetics* 6, 1-4.

Persing,LR., y Bindon,BM.(1983). The Booroola Merino and the performance of medium non-peppin crosses at Armidale.WoolTechnology and Sheep Breeding.31(1).

Sharpe M., Regulation of spermatogenesis. In Knobil E., NEIL J., editors. 1994. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press Ltd.1363–1434.

Shimokawa, H., Ogata, Y., Sasaki, S., Sobel, M.E., Mc Quillan, C.T., Termine, J.D. and Young, M.F. (1987) Molecular cloning of bovine amelogenin cDNA. Adv. Dent. Res. 1:293-297.

Salvador J., Molina C., Solórzano S., Cázarez S., Rendón H., Murillo J., Ríos J. (2008). Identificación del sexo mediante análisis molecular del gen de la amelogenina. Rev Mex Patol Clin, 55: 17-20.

Van Look, K.J.W., 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. Reproduction 127, 527–535.

Van Munster, E B. 2002. Interferometry in flow to sort unstained X- and Y chromosome bearing bull spermatozoa. Cytometry 47: 192-199.

Rosemarie W., Christian Pitra., y Christa Kult., 2006. Amelogenin Cross- Amplification in the Family Bovidae and its Application for sex determination. sexing Technology into the ART. Tool box. Animal Reproduction Science: 82 – 83.

Salomon S., y Maxwell W. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. 62: 77-111.

Sauer R, Coulam CB, Jeyendran RS. 2012 .Chromatin intact human sperm recovery is higher following glass wool column filtration as compared with density gradient centrifugation. Andrologia. 44:248-251

Samardzija M., Karadjole M., Getz IM., Cergolj Z M., Dobranic T. 2006. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. Reprod Biol Endocrinol 4: 58. doi: 10.1186/1477-7827-4-58

Santiani A, Sandoval R., Coronado L. 2004. Estudio de la integridad de membrana en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hiposmótico. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Samardzija M., Karadjole M., Getz I., Makek Z., Cergolj M., Dobranic T. 2006. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. Reprod Biol Endocrinol 4: 58. doi: 10.1186/1477-7827-4-58

Seidel Jr., GE. 2003. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59: 585–598.

Seidel GE. 2003. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59: 585-598 Semen bovino. *Revista del Patronato de Biología Animal*. 4: 249-58.

Silverman AMT., Drouin RG., Zack JO and Ericsson SA. 2002. female sex. Slection using clomiphene citrate and albumina separation of humano sperm. *Human Reproduction* 17:1254-1256.

Sureka P., Nilani K., Eswaramohan T., Balasubramaniam K. 2013. Sex preselection by quantification of Ychromosome bearing spermatozoa in goat species. *International Journal of Scientific and Research Publication*. 3(1):1-4.

SIAP 2011. Buenas perspectivas para los precios de ovinos en todo el mundo ante la falta de oferta. (Revista del borrego).

Ennis S., Gallagher TF. 1994. A PCR –based sex-determination assay incattle based on the bovine amelogenin locus.

Etel L., Sales Francisco. 2000. Retajos en Producción Ovina. 2000. ISSN: 0717-4829.
35. López A., Regueiro M., Castrillejos, A Pérez R. 2011. Procesamiento y

congelación del semen ovino para inseminación artificial, la dilución de semen de carnero en pajuela 34.

Eastoe JE. (1965). The chemical composition of bone and teeth. Adv Fluorine Res Dent Prevent 3: 5-17

Tobar C. 2005. Ficha Técnica de un producto de huevo pasteurizado y pulverizado – Yema de Huevo Pasteurizada y Pulverizada definida con la Formula - YPP-00. Granja Buenos Aires, S.A.

Tang YW., Seters SE., LID H., Kohn J., y GM. Procop. 2005. Comparative evaluation of thee comercial systems for nucleica cid extraction from urine epecimens journal of clinical microbiology.

Timothy, HN. (1998). Biología Molecular en Medicina. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.

Urbina CE. 2012. Utilización de Semen bovino sexado en inseminación artificial, 43: 34-36

UNO. 2011. Problemática y oportunidades de la cadena productiva de la carne de ovino p: 31.

Ueda K., Yanagimachi R. 1987. Sperm chromosome analysis as a new system to test human X- and Y-sperm separation. *Gamete Res.* 17: 221–228.

Unterberger F. 1932. Sex determination and hydrogen ion concentration. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 58: 729.731

Urbina QCE. 2013. Tesis. Recuperado a partir de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/439> vancouver.

Valasek MA., Repamel JJ. 2005. The power of real time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 29, 151-159.

Van ME., Stap JR., Hoebe AG., MeermanTE., and Aten J. 1999. Difference in volume of X- and Y- chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content. *Cytometry* 35: 125-128.

Wheeler Mb., Rutledge J., Fischer BA., Van ET., y Malusky SBD. 2006. Application of sexad semen technology to in vitro embryo in cattle. *Thenogeneology.*67:456

Wang ZYS y Xu Z. 1994. Effects. of Collection Methods on Recovery Efficiency, Maturation Rate and Subsequent Embryonic Developmental Competence of Oocytes in Holstein Cow. *Asian Aust J AnimSci.* 67:49.

Wolf CA., Brass KE., Rubin MIB., Pozzobon SE., Mozzaquatro FD., De La Corte, F.D.

2008. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction*, v.5, n.3/4: 110-115

Yaeram J., Setchell BP., and Maddocks S. 2006. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reproduction Fertility. Dev.* 18:647-53.

Zizeddin A., Ashkar FA., King WA., and Revay T. 2014. Enrichment of Y-chromosome-bearing bull spermatozoa by swim-up through a column. *Reprod. Dom. Anim.* 49: 1- 4