

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

TESIS PROFESIONAL

**CAPACIDAD FECUNDANTE BAJO PRUEBAS *IN VITRO* DE
ESPERMATOZOIDES OVINOS SEXADOS EN GRADIENTES DE ALBÚMINA
SÉRICA HUMANA.**

PRESENTA:

ANTONIO CABRERA DOMÍNGUEZ.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

DIRECTOR DE TESIS:

DR. VÍCTOR MANUEL MEZA VILLALVAZO.

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D. C. ROSALINA MA. DE LOURDES REYES LUNA.

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA. JULIO DE 2017.

DEDICATORIAS

Queridos papá y mamá: Antonio Cabrera Canseco y Virginia Domínguez Sánchez, siempre han sido un ejemplo para mí, gracias a ustedes estoy alcanzando mis metas con mucho orgullo. Les debo un eterno agradecimiento y mi retribución total por su gran cariño, esfuerzo y sacrificio al darme la oportunidad de alcanzar mis sueños y poder superarme. Gracias amados Padres.

A mis hermanos: Guadalupe Cabrera Domínguez de quien aprendí a encontrar la fortaleza para no rendirme jamás y levantarme en cada tropiezo, y de **Edgar Daniel Cabrera Domínguez**, quien me enseñó a tener la fuerza y el valor para confrontar los problemas.

A toda mi familia: el resultado de todo sacrificio y esfuerzo es el éxito, gracias a todos los que creyeron en mí.

A mis amigos: por ser parte de mi vida y haber compartido parte de las tuyas conmigo, y a mis compañeros de clases por haber sido parte de esta trayectoria.

A mis profesores y asesores: por todo el tiempo, la paciencia y conocimientos compartidos para mi aprendizaje y formación.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por protegerme, acompañarme y guiarme a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y de felicidad.

A mi madre Virginia Domínguez Sánchez, por todos los cuidados, todo el cariño y todos los sacrificios que has hecho por mí, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como un hombre de bien, y por ser la mujer que me dio la vida. No hay palabras en este mundo para agradecerte mamá.

A mi padre Antonio Cabrera Canseco, el hombre que me dio la vida, el cual, a pesar de haberlo perdido a temprana edad, ha estado siempre cuidándome y guiándome desde el cielo. Por el valor y el coraje que tuvo para levantarse ante cualquier adversidad, por las enseñanzas que me dejó, y por darme ánimos siempre de seguir adelante, muchas gracias papá.

A mis hermanos Guadalupe Cabrera Domínguez y Edgar Daniel Cabrera Domínguez, porque el amor de dos hermanos no tiene sustituto, porque son la razón por la cual me vi en este punto de mi vida, los quiero. A mi sobrina Aylin por ser la niña arcoíris que llegó a nuestras vidas, y a mi cuñado Gil por apoyarnos y querernos como un papá.

A mi asesor de tesis: Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo, por su disponibilidad de tiempo para aclarar mis dudas, su paciencia, comprensión y porque siempre procuró tenerme todo para poder trabajar en él laboratorio. Así como también al equipo de biotecnología animal con los cuales compartimos nuestros conocimientos y amistad: Raquel, Margarita y Rosalía.

A mi Co-asesor de tesis Dra. Rosalina Ma. de Lourdes Reyes Luna, por haberme aceptado en la estancia profesional y compartir conmigo sus conocimientos, tiempo y paciencia, por guiarme durante todo el proceso de mi tesis.

A mis amigos: Keyla (Homie) porque llegaste a ser mi confidente y consejera, gracias por siempre escucharme, a Rosita por tu gran amistad y confianza, Jarim por ser esa amiga que siempre se mantuvo fuerte a los problemas y supimos salir a adelante, Alan por la confianza y los buenos ratos que vivimos y Marcelo por haber compartido conmigo su gran amistad, a todos ustedes gracias por ser parte de mi vida y compartir conmigo grandes y maravillosos momentos, también a Iván, Raquel, Salvador, Dra. Nelly por su amistad y consejos que me fueron de mucha utilidad. A mi tía Edith que me apoyo muchas veces, por escucharme y darme buenos consejos, la quiero tía.

A mis demás amigos: Rosalía, Margarita, Saraí, Xóchitl, Laura, Armando y todos mis compañeros de generación, por la amistad brindada y su apoyo durante mi estancia en la universidad.

A la Dra. Blanca, Dra. Jacqueline, Dr. Paul, Dr. Abad, Dr. Edgar, M.C. Vice-Rector Héctor, Dr. Jaime, Dr. Cesar, por los equipos, reactivos, asesorías y estancias profesionales.

CONTENIDO.

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
GLOSARIO DE ABREVIACIONES.....	VIII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Espermatozoide.....	4
2.1 Partes del espermatozoide.....	4
2.2 Vida de los espermatozoides.....	5
2.3 Capacitación.....	6
2.4 Fisiología reproductiva del ovino macho.....	7
2.5 Colección de semen.....	8
2.6 Evaluación de las características de una muestra seminal.....	9
2.6.1 Color.....	9
2.6.2 Aspecto.....	9
2.6.3 Volumen.....	10
2.6.4 pH.....	10
2.6.5 Motilidad Individual.....	10
2.6.6 Concentración espermática.....	11
2.6.7 Vitalidad.....	11
2.7 Capacitación espermática.....	12
2.7.1 Capacitación espermática <i>in vivo</i>	13
2.7.2 Capacitación espermática <i>in vitro</i>	14
2.8 Técnicas de selección espermática.....	14
2.9 Diferencias en el contenido de ADN.....	15
2.10 Selección del sexo de los espermatozoides.....	16
2.10.1 Sensibilidad al pH.....	16
2.10.2 Carga eléctrica de la superficie de la membrana.....	17

2.10.3	Diferencias de la velocidad de migración (Swim-up).....	18
2.10.4	Diferencias en el contenido de ADN (citometría).	19
2.10.5	Diferencias de densidad.	19
2.10.6	Diferencias de densidad con albumina sérica humana (HSA).	20
3.0	Estimación de la fertilidad <i>in vivo</i> mediante pruebas <i>in vitro</i>	21
3.1	Análisis de la interacción ovocito-espermatozoide. Sistemas de fecundación <i>in vitro</i>	21
3.2	Prueba de unión a zona pelúcida.....	22
3.3	Prueba de fecundación <i>in vitro</i> homoespecíficos.	22
4.	JUSTIFICACIÓN.	24
5.	HIPÓTESIS	25
6.	OBJETIVOS.	26
6.1	General:.....	26
6.2	Particular:	26
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.	27
7.1	Ubicación.	27
7.2	Manejo de semen.	27
7.2.1	Análisis microscópico.	27
7.2.2	Motilidad Pre y Post separación:.....	27
7.2.3	Concentración Pre y Post separación:.....	28
7.2.4	Vitalidad Pre y Post separación:	28
7.3	Preparación de columnas de HSA.	28
7.4	Obtención de los ovocitos.	29
7.5	Cultivo <i>in vitro</i> de ovocitos.....	29
7.6	Fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos con semen fresco y sexado.	30
7.7	Prueba de unión a zona pelúcida.	30
7.8	Prueba de fecundación <i>in vitro</i> homoespecífico.	31
8.0.	Análisis estadístico.....	31

9.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
9.1 Resultados para semen fresco sin sexar.....	32
9.2 Resultados para semen sexado en los gradientes de densidad.....	34
9.3 Resultados para pruebas <i>in vitro</i> de capacidad fecundante.....	38
10.0 CONCLUSIONES.....	42
11.0 PERSPECTIVAS.....	43
12.0 ANEXO.....	44
13.0 BIBLIOGRAFÍA.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencia del contenido de ADN.	15
Tabla 2. Parámetros macroscópicos	32
Tabla 3. Parámetros microscópicos de semen sin sexar.....	33
Tabla 4. Parámetros microscópicos de semen fresco y sexado.....	35
Tabla 5. Prueba de interacción con ZP y de penetración con semen fresco y sexado del gradiente del 20%.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes que componen un espermatozoide.....	4
Figura 2. Proceso <i>in vivo</i> de capacitación espermática.	12
Figura 3. Ovocitos penetrados	40

GLOSARIO DE ABREVIACIONES.

CIV = Cultivo *in vitro*.

CO₂: Dióxido de carbono.

FIV = Fertilización *in vitro*.

h: Hora.

MIV = Maduración *in vitro*.

CE: Capacidad espermática.

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos.

pH: Potencial de hidrogeno.

°C: Grados centígrados.

CASA: Sistema de análisis seminal computarizado.

Mill: Millones.

HSA= Albúmina sérica humana.

seg: segundos.

mL: mililitros.

cm: centímetros.

msnm: metros sobre el nivel del mar.

ZP: Zona pelúcida.

EZP's: Espermatozoides

EZP: Espermatozoide.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

FSH: Hormonas folículo estimulante.

LH: Luteinizante

Min: Minutos.

RESUMEN.

En México se ha originado una creciente demanda en la producción de carne sobre el sector ovino, el estado de Oaxaca tiene una participación baja de 7.0% (SAGARPA, 2011). Para equilibrar la producción ovina en el estado y en el país se han aplicado biotecnologías reproductivas como el sexado, permitiendo a los ganaderos mantener mayores proporciones de machos y hembras en su rebaño según sea la necesidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad fecundante bajo pruebas *in vitro* de EZP's ovinos sexados en HSA. Se obtuvieron eyaculados de ovinos fértiles para realizar la separación de EZP's en columnas compuestas por gradientes de densidad (10, 15 y 20% de HSA). Las características evaluadas en semen fresco fueron: volumen, porcentaje de motilidad, vitalidad y concentración, obteniendo valores de: 0.5 mL, 96.20%, 98.10% y 3187.56×10^6 mill/mL, respectivamente. Se sometieron a separación 300×10^6 mill/mL de EZP's por columna y se incubaron a 37.5°C por 1 h. Se retiró cada fracción con intervalo de 10 min cada una y se determinó el porcentaje de motilidad, vitalidad y concentración espermática para los 3 gradientes. Se evaluaron las pruebas *in vitro* de capacidad fecundante de EZP's después de la separación (interacción ovocito – espermatozoide y penetración). Se observó que la motilidad del semen fresco (96.20%) disminuyó en comparación a la motilidad de la capa de HSA al 10% (72.20%). Conforme los EZP's alcanzan las capas de mayor densidad el porcentaje de vivos disminuye siendo de 70.20, 84.20 y 80.20% para el 10, 15 y 20% respectivamente, observándose el mismo comportamiento para la concentración espermática de los 3 gradientes (106.3 , 83.77 y 75.19×10^6 mill/mL). Bajo 1^{er} prueba *in vitro* para capacidad fecundante con semen fresco y sexado del 20% se determinó por conteo una cantidad >1000 EZP's en contacto con la ZP de ovocitos inmaduros, con la 2^{da} prueba *in vitro* los mismos ovocitos se incubaron junto con los EZP's por 12 hrs, obtuvimos porcentajes de 86 y 90% de ovocitos penetrados con semen fresco y sexado del 20%, se observó mediante tinción el núcleo del EZP's en proceso de descondensación dentro del citoplasma del ovocito. Se determinó mediante análisis de Chi cuadrada en SPSS que el sexado en gradientes de densidad en HSA no tiene efecto estadísticamente significativo sobre los EZP's sexados ($p > 0.05$).

1. INTRODUCCIÓN.

La técnica de sexado de semen representa ventajas muy importantes desde el punto de vista productivo y económico, ya que permite la elección del sexo de la cría según sean las demandas de producción, generando así, mayores bienes y servicios sobre el sector ganadero. Sin embargo, para poder ofrecer este bien o servicio a los productores es necesario realizar una serie de pruebas que determinen la eficiencia del sexado comprobando que el estado fisiológico de la célula fecundante no se vea afectado por el proceso de separación. Los EZP's logran adquirir su capacidad fecundante de forma *in vivo* durante su viaje hacia el ovocito, experimentando cambios iniciales y modulando su estado funcional, en mamíferos de fecundación interna los EZP's desarrollan su movilidad cuando pasan a través del epidídimo (Baldi *et al.*, 2000, Mortimer *et al.*, 1989), durante este paso sufren modificaciones morfológicas y bioquímicas necesarias que les permiten convertirse en una célula fecundante (Aurich *et al.*, 2008, Balla *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, se ha definido a la capacidad fecundante de los EZP's como: La habilidad que logran adquirir estas células para fecundar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto (Yanagimachi *et al.*, 1994). Dichas cualidades adquiridas son: la unión con la ZP, el desencadenamiento de la reacción acrosómica, la penetración de la ZP, la unión con la membrana plasmática del ovocito y la fusión con dicha membrana (Berger *et al.*, 1996).

El hecho de que se sigan desarrollado innumerables técnicas de análisis de calidad del semen indica que hasta el momento no se ha llegado a obtener una técnica con una precisión satisfactoria que indique la calidad y capacidad de los EZP's para fecundar. Siendo en los laboratorios de reproducción asistida donde se han realizado experimentos como: el ensayo de penetración de ovocitos de hámster dorado libres de ZP (Yanagimachi *et al.*, 1976), la desnaturalización del ADN, la evaluación de la membrana espermática, la motilidad y la reacción acrosómica (Cardona *et al.*, 2005) entre otras, las cuales proporcionan solo un estimado del estado de la célula.

En la mayoría de los casos estas técnicas únicamente pueden explorar una faceta del proceso reproductivo, y esto sólo permite dar una información parcial del potencial del EZP para fecundar después de haber sido expuesto a diversos procesos (sexado). La motilidad es un buen indicador del metabolismo celular y de la funcionalidad de la membrana espermática. Sin embargo, la relación con la fertilidad no es estrecha (Woerliders *et al.*, 1991). También se han desarrollado los sistemas de análisis computarizado (CASA) que han permitido estudiar los parámetros del movimiento espermático (velocidad, movimiento lateral, etc.) (Holt *et al.*, 1997), sin embargo, la relación entre la motilidad y la fertilidad está sumida en una continua controversia (Pursel *et al.*, 1984; Strezezek *et al.*, 1984; Martínez *et al.*, 1986; Berger *et al.*, 1988; Galli *et al.*, 1988; Berger *et al.*, 1989) y no se pueden basar en esta para predecir la funcionalidad de la célula espermática con mayor precisión y confiabilidad. Por tal motivo se siguen desarrollando técnicas o pruebas *in vitro* que nos permitan predecir con mayor exactitud el estado fisiológico de la célula fecundante después de haber sido sometidas a cualquier proceso de separación, y con ello tener un estimado de que tan eficiente y amigable es la técnica empleada con el EZP.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Espermatozoide.

El EZP es una célula haploide sexual o gameto del macho producidos en los túbulos seminíferos de los testículos, su principal función es combinar su ADN con el ovulo. Es una de las células más investigadas y su función es la formación de un cigoto totipotente al fusionar su núcleo con el del gameto femenino (ovulo), fenómeno que dará lugar a un embrión y posteriormente al feto (Gibbons *et al.*, 2004). En la fecundación, los EZP's dan el sexo a la nueva célula, pues pueden llevar cromosomas "X" e "Y", mientras que el ovulo lleva solo el cromosoma X. Fueron identificados por primera vez en 1967 por Anton van Leeuwenhoek, el inventor de los primeros microscopios potentes (Aisen *et al.*, 2004).

2.1 Partes del espermatozoide.

Se identifican tres partes principales que constituyen al EZP (Figura 1) (Sutovsky *et al.*, 2006).

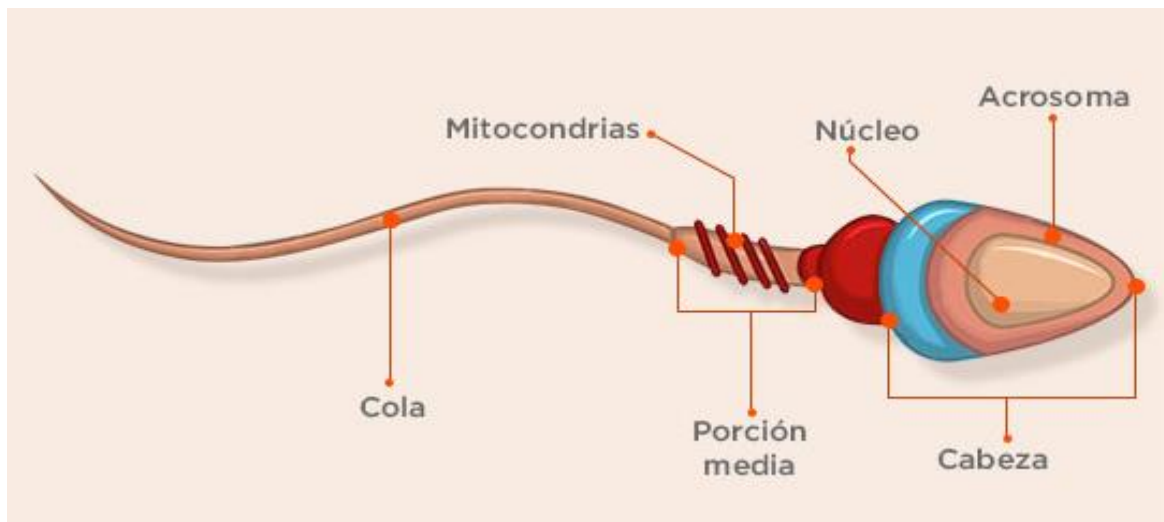


Figura 1. Partes que componen un espermatozoide. Se observan las tres partes principales de un EZP: Cola, porción media y cabeza.

Cabeza: consta de un núcleo y en su parte superior o punta existe una zona más gruesa llamada acrosoma, encargada de perforar la membrana del ovulo para lograr la fertilización. La cabeza del EZP contiene ADN que, al combinarse con el gen del gameto de la hembra creara el huevo o cigoto.

Porción media: cuerpo alargado con gran cantidad de energía para lograr el movimiento.

Cola: también llamada flagelo, es apéndice en forma de látigo que permite el desplazamiento de estas células en el líquido seminal, a fin de alcanzar el útero y la trompa de Falopio en el aparato reproductor de la hembra y fertilizar el ovulo. La cola se divide en pieza principal (otorga la movilidad) y pieza terminal.

2.2 Vida de los espermatozoides.

Después que el macho alcanza la pubertad, los EZP's se forman continuamente a partir de células madre localizadas en los túbulos seminíferos de los testículos, donde permanecen 10 semanas hasta madurar, de no ser expulsados, se descomponen y son reabsorbidos por el cuerpo (Sutovski *et al.*, 2007).

Para que los EZP's puedan sobrevivir fuera del macho, necesitan condiciones específicas: Temperatura entre los 37 y 37.5°C y una acidez o pH de 7 a 7.5.

En eyaculaciones fuera de la vagina, la vida de los EZP's es limitada, en contacto con el aire mueren casi al instante. La vida media dentro del útero de la hembra es de 2 a 16 horas. Tras alcanzar las trompas de Falopio los EZP's pueden vivir 2 días en espera de la ovulación, debido a que la acidez en esta zona es propicia para ellos (Aisen *et al.*, 2004).

2.3 Capacitación.

Aunque el mecanismo no se conoce completamente, las investigaciones desarrolladas hasta el momento sugieren que los EZP's maduran y adquieren capacidad de activación durante el pasaje a través del conducto espermático cuyo fluido (plasma seminal) es de pH básico y rico en bicarbonato (HCO_3) (Bywater *et al.*, 1970). Permanecen inmóviles hasta ser liberados al medio acuoso donde diferentes factores interactúan para desencadenar una respuesta que produce la activación de la movilidad.

Cuando se une el EZP al ovocito, se induce otro proceso denominado reacción acrosomal (exocitosis), así como la hiper movilidad, que es un movimiento especial del flagelo, el cual facilita su desplazamiento, la penetración de las cubiertas del ovocito y finalmente la unión con este. El proceso de capacitación puede también ser inducido *in vitro*, para lo que una mejor comprensión de este fenómeno es mencionar que estructuralmente el EZP se divide en:

a) Cabeza: Es el núcleo, con ADN super enrollado, gracias a las proteínas denominadas protaminas que sustituyen a las histonas en otros tipos celulares, con una envoltura nuclear de la cual se han removido durante la espermiogenesis los complejos de poro nuclear, con excepción de algunas especies que las presentan. El citoesqueleto participa en el soporte de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal y algunos de sus elementos son termosensibles. El principal elemento del citoesqueleto de la cabeza del EZP es la teca peri nuclear, que es una cápsula rígida que cubre el núcleo del EZP de mamíferos y tiene como función la unión de las membranas espermáticas y la preservación de su integridad. La capa postacrosomal se considera que participa en la activación del ovocito durante la fertilización y es el sitio para la actina en los EZP's de algunos mamíferos (Arenas *et al.*, 2010).

b) Flagelo: Es la parte encargada del movimiento, se divide en cuatro regiones: la pieza de conexión que une a la cabeza con el flagelo, la pieza media que es también llamada cuello y donde se encuentran las mitocondrias en un arreglo helicoidal, la pieza principal que abarca la mayor parte del flagelo utilizado en la propulsión, y la vaina fibrosa o parte terminal de la cola. Cada región tiene funciones específicas en el movimiento, reconocimiento del ovocito y la fecundación (Arenas *et al.*, 2010).

2.4 Fisiología reproductiva del ovino macho.

La función testicular de los machos en cualquier especie puede definirse como la capacidad para producir gametos en cantidad y calidad adecuada para llevar a cabo la fertilización. Para esto, es necesario que el individuo produzca la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es una hormona sintetizada en el hipotálamo y que actúa dentro de la fisiología del macho elevando la FSH y LH a nivel hipofisiario, las cuales tienen efecto directo sobre la espermatogénesis y la secreción de testosterona (Hafez *et al.*, 2000)

LH es la hormona encargada de estimular la producción de testosterona por las células de Leydig en el estroma testicular (Sutovsky *et al.*, 2006). Asimismo, en ovinos produce un incremento en la concentración de testosterona sérica y un incremento de la actividad sexual (Andaur *et al.*, 2004).

Los carneros alcanzan la madurez sexual en la pubertad, esta se define como la edad en la cual los órganos reproductores del carnero se vuelven funcionales. Ocurre entre los 5 y 7 meses de edad y cuando el animal tiene entre el 50-60% de su peso maduro. La producción de esperma en carneros toma alrededor de 49 días (7 semanas). El tamaño testicular es un indicador de la habilidad del carnero de producir EZP's. Además, el palpar el epidídimo ayuda a determinar las reservas de esperma (Sheep Production Handbook, 2002). Su capacidad para producir semen y realizar la monta se mantiene durante todo el año.

La calidad del semen es superior en otoño y el invierno y bajo en primavera y el verano, el volumen del eyaculado y la concentración espermática también disminuyen (Hafez *et al.*, 1952). La actividad sexual en los carneros cambia con la estacionalidad, influenciada por el cambio en los periodos de luz, la edad y jerarquía social (Schanbacher *et al.*, 1976; Donell *et al.*, 2006).

2.5 Colección de semen.

El uso de la vagina artificial se ha convertido en uno de los mejores métodos para la colección de semen en ovinos por su rapidez y limpieza, por no ser estresante para el animal y proporcionar un semen de alta calidad. Este dispositivo es una imitación de la vagina de la oveja y que proporciona los estímulos térmicos (temperatura) y mecánicos (presión) adecuados para la erección del pene y la eyaculación (Donell *et al.*, 2006).

La vagina artificial consta, normalmente, de un cilindro que puede ser de goma y es rígido de 12 a 15 cm de largo y alrededor de 5 cm de diámetro en el cual se hace un orificio provisto de un tapón de rosca. Por el centro del dispositivo se introducirá el agua caliente a 40-42 °C y aire para simular las condiciones de temperatura y presión adecuadas. Entre el tubo de la vagina y el agua caliente, debe existir un tubo de látex que sirve como funda para la vagina (Bearden *et al.*, 1982). Se utiliza una hembra para estimular la monta. Cuando el pene entra en contacto con la superficie caliente de la vagina artificial, el semental da el característico golpe de pecho y eyacula dentro del tubo colector (Evans *et al.*, 1990). Existen otras técnicas de colección de semen como la de electro eyaculación, que consiste en introducir un electrodo bipolar, a una longitud no mayor de 10 cm, en el recto del macho. Se aplican estímulos eléctricos en serie y a intervalos de tiempo definidos consiguiendo la erección del pene y la posterior eyaculación, sin embargo, se obtienen eyaculados de menor calidad y este método afecta la estabilidad de los EZP's (Hafez *et al.*, 2002).

2.6 Evaluación de las características de una muestra seminal.

La evaluación espermática nos permite estimar la fertilidad de cualquier semental y consiste en evaluar los parámetros espermáticos que son indicadores de la calidad del semen (Sorensen *et al.*, 1991). Estos parámetros pueden ser de carácter macroscópico (color, aspecto, volumen, pH) ya que pueden ser evaluados a simple vista de la muestra seminal y microscópicos (motilidad, concentración espermática, vitalidad) que deben ser evaluados utilizando un microscopio (Aisen *et al.*, 2004).

2.6.1 Color.

La cantidad de EZP's presentes en el eyaculado hace que la muestra tome una coloración blanquecina amarillenta cuando la muestra es de buena calidad. Cuando es de baja calidad, es similar a la leche acuosa (Hafez *et al.*, 2002).

Un color rojizo indica la presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose en estos casos, desechar el eyaculado y proceder a la revisión del carnero (Gibbons *et al.*, 2004).

2.6.2 Aspecto.

El aspecto del semen depende de la relación de 2 constituyentes: la concentración de EZP's y la calidad del plasma seminal. Las muestras de alta consistencia contienen más EZP's que las muestras más acuosas. El semen debe tener un aspecto cremoso lechoso y uniforme (Evans *et al.*, 1990).

2.6.3 Volumen.

Cuando la recolección se realiza con vagina artificial, se obtienen eyaculados de aproximadamente 1 mL. El volumen varía según la edad, tamaño, condición corporal del animal, frecuencia de colección y destreza del operador (Gibbons *et al.*, 2004). Los volúmenes de eyaculados pueden admitirse como normales cuando sus rangos van de 0.5 a 2.0 mL con una media de 0.8 mL (Palma *et al.*, 2001).

2.6.4 pH.

En ovinos, el pH tiende a la acidosis, fenómeno importante ya que en él radica su capacidad fecundante. La reacción alcalina es características de una escasa fertilidad y muchas veces va acompañada de una disminución en la concentración espermática y motilidad (Evans *et al.*, 1990).

2.6.5 Motilidad Individual.

En algunas especies, parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del EZP. Si existe menos del 40% de EZP's con movimiento lineal progresivo, es menos probable que haya fertilidad. Debido a la influencia que tienen las variaciones de temperatura sobre la motilidad espermática, las muestras deben ser evaluadas tan pronto sea posible.

Se consideran EZP's móviles aquellos que aparecen activos y con movimiento progresivo. La motilidad individual es el porcentaje de EZP's móviles con respecto al total de EZP's visualizados (Sorensen *et al.*, 1991).

2.6.6 Concentración espermática.

La concentración espermática está definida como el número de EZP's por unidad de volumen, expresada normalmente en millones por mL de eyaculado. Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y exactitud (Evans *et al.*, 1990).

Son varios los métodos que permiten determinar la concentración espermática. Entre ellos, se encuentra la cámara de Neubauer y el método del fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos y, si bien el fotocolorímetro permite un recuento más rápido, su costo es más elevado que la cámara de Neubauer (Gibbons *et al.*, 2004).

2.6.7 Vitalidad.

La membrana celular de los EZP's representa una barrera al paso de tinciones al medio intracelular. Los EZP's vivos no dejan pasar ningún tipo de colorante a su medio intracelular, mientras que los muertos, los absorben. Este fenómeno biofísico permitió el desarrollo de técnicas orientadas a la diferenciación de EZP's vivos de muertos (Fernández *et al.*, 1998).

Actualmente, existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar EZP's vivos y muertos. Si el EZP está vivo, la membrana celular actúa como barrera impermeable impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse (Brantmeier *et al.*, 1987).

2.7 Capacitación espermática.

En condiciones fisiológicas, los EZP's eyaculados de mamíferos no reúnen las condiciones adecuadas para fecundar el ovocito, debiendo experimentar una serie de cambios estructurales y fisiológicos antes de adquirir dicha capacidad. Este proceso ocurre *in vivo* en el tracto genital de la hembra y se conoce con el nombre de capacitación espermática (CE). Los cambios más importantes se dan a nivel de la membrana celular facilitando la penetración de las cubiertas del ovocito, a esto último se le denomina reacción acrosómica (Figura 2). Además, el EZP adquiere hiperquinesis que es el batido vigoroso del flagelo y una mayor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, características que definen lo que se conoce como hiperactivación (Parks *et al.*, 1990).

Es posible realizar la CE *in vitro* utilizando medios que simulen las condiciones del tracto reproductor de la hembra (Lane *et al.*, 1999).

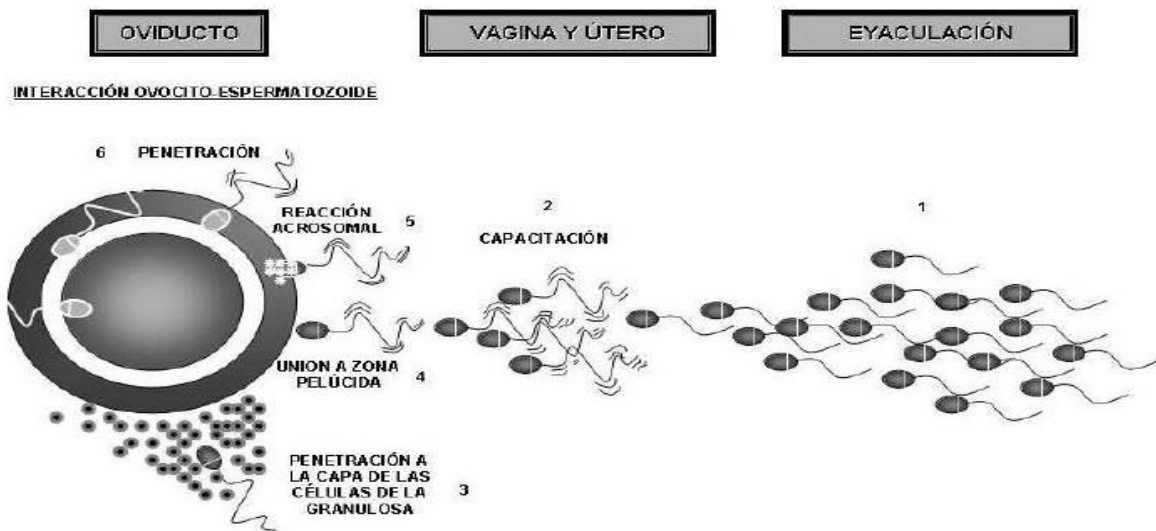


Figura 2. Proceso *in vivo* de capacitación espermática. Imagen tomada de Arenas *et al.*, 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosómica del EZP. Proceso de CE comienza, desde el eyaculado y continúa durante el recorrido por el útero, finalizando cuando el EZP está en contacto con el ovocito.

2.7.1 Capacitación espermática *in vivo*.

Los tubos seminíferos dentro de los testículos son los encargados de la producción de los EZP's, los cuales pasan hacia los conductos eferentes que desembocan en la cabeza del epidídimo. La cabeza y el cuerpo del epidídimo se encargan de iniciar la maduración, se adquiere la motilidad de los EZP's y en la cola se almacenan. Los EZP's pasan de la cola del epidídimo al conducto deferente, el cual actúa como pasaje de los mismos durante la eyaculación. Posteriormente, los EZP's siguen su recorrido por el ámpula del conducto deferente, por la uretra y posteriormente pasan por las glándulas bulbouretrales, las glándulas seminales y la próstata. Las glándulas seminales aportan plasma enriquecido con proteínas y carbohidratos y la próstata secreta un líquido viscoso que limpia y lubrica la uretra, a la vez que aumenta ligeramente el volumen del semen. Finalmente, los EZP's llegan al pene, siendo expulsados durante la eyaculación por la uretra peneana (Hafez *et al.*, 2002).

En mamíferos, el semen fresco recién eyaculado es incapaz de fecundar al ovocito, adquiriendo esta competencia durante su recorrido dentro del aparato genital femenino; a este proceso se le denomina capacitación espermática (Parks *et al.*, 1990). La CE permite al EZP llegar a la ZP del ovocito donde este induce la reacción acrosómica y el EZP's, puede así, fecundar al ovocito (Cormier *et al.*, 2003).

En el tracto reproductor femenino se encuentran lipoproteínas de alta densidad (HDL) localizadas en los folículos y en el fluido del oviducto (Brantmeier *et al.*, 1987; Ehrenwald *et al.*, 1990). Son estas lipoproteínas las que inducen la CE (Azzarini *et al.*, 1988). Ellas facilitan la salida de colesterol del EZP lo cual ocurre durante las primeras etapas de la capacitación (Thérien *et al.*, 1997).

2.7.2 Capacitación espermática *in vitro*.

Debido a la gran dificultad que presenta el estudio de la capacitación espermática de manera fisiológica en el tracto reproductor de la hembra, se ha conseguido inducir este proceso en el laboratorio a través del uso de medios de cultivo que simulan las condiciones del tracto reproductor femenino. A esto se le denomina capacitación *in vitro*. Yanagimachi y Chang (1963) fueron los primeros en reportar que el EZP maduro puede ser capacitado *in vitro*, el éxito de la FIV depende de una adecuada capacitación del EZP (Gadella *et al.*, 2001). Se han propuesto algunos sistemas para capacitar *in vitro* EZP's de carnero y de otras especies domésticas que utilizan diversas sustancias, siendo una de las más utilizadas la heparina (Merkies *et al.*, 2000). Lo que se busca con estas sustancias es similitud con los inductores naturales de la capacitación presentes en el tracto genital de la hembra (Palma *et al.*, 2001).

2.8 Técnicas de selección espermática.

La selección espermática es un mecanismo natural en todas las especies y está asociada al transporte de los EZP's en las vías del aparato reproductivo de la hembra. Constituye un proceso dinámico que busca mejorar la calidad del EZP a fecundar al ovocito por medio de mecanismos físicos y químicos de selección, realizados en forma paulatina en los diferentes órganos reproductivos de la hembra (Bjorndahl *et al.*, 2005).

Con el fin de descartar los EZP's muertos, elegir los EZP's con mayor motilidad y separarlos del líquido seminal y del diluyente; se llevan a cabo técnicas de selección espermática que permiten la recuperación y selección de EZP's. Para ello, diferentes métodos de selección espermática han sido descritos en las diferentes especies, siendo los más utilizados: los lavados repetidos (Fukuda *et al.*, 1990), swim-up (Parrishy *et al.*, 1987), el uso de gradientes (Bioelanski *et al.*, 1992) y la filtración a través de fibra de vidrio (Stabbings *et al.*, 1991).

La técnica de selección espermática por gradientes de densidad selecciona células en base al principio de sedimentación. Con esta técnica, los EZP's presentan menos contaminación de plasma seminal respecto a los tratados con swim up (Shelden *et al.*, 1988; Bjorndahl *et al.*, 2005). Además, aumenta la concentración de EZP's móviles, los cuales están asociados al aumento a la tasa de fecundación tanto en inseminación intrauterina como en fecundación *in vitro* (Zwalmen *et al.*, 1991). La utilización de gradientes de densidad rinde buenas concentraciones de EZP's móviles. Además, con esta técnica, se ven EZP's de buena morfología, buen empaquetamiento de ADN, acrosoma intacto y con buena capacidad fecundante (Prakash *et al.*, 1998).

2.9 Diferencias en el contenido de ADN.

Los métodos empleados para separar EZP's en mamíferos se basan en la evidencia que aquellos EZP's portadores del cromosoma X tienen un mayor peso que los EZP's portadores del cromosoma Y, debido a una mayor cantidad de cromatina. El ADN (ADN super enrollado, gracias a las proteínas denominadas protaminas) del cromosoma X en relación con el cromosoma Y varía significativamente entre las especies, como se muestra en la tabla 1 (Garner *et al.*, 2006)

Tabla 1. Diferencia del contenido de ADN.

Especie	Humana	Caprina	Porcina	Equina	Bovina	Ovina
Diferencia de ADN X-Y (%).	2.8	3.5	3.6	3.7	3.8	4.2

La especie ovina cuenta con mayor contenido de ADN entre ambos cromosomas, lo cual favorece la separación de EZP's en gradientes de densidad y en cualquier otra técnica de separación que se desee emplear.

2.10 Selección del sexo de los espermatozoides.

Para que se pueda llevar a cabo la separación de EZP's portadores del cromosoma "X" e "Y", es necesario tomar en consideración los siguientes puntos (Palma *et al.*, 2001): Sensibilidad al pH, carga eléctrica de la superficie de la membrana, velocidad de migración, contenido de ADN y diferencias de densidad (Gerfen *et al.*, 1994). Cualquier técnica de sexado debe cumplir con 3 puntos fundamentales: tener una desviación evidente en la tasa de producción de EZP's X/Y, la técnica no debe interferir en la capacidad fecundante *in vivo* o *in vitro* de los EZP's separados y se deben obtener embriones vivos capaces de seguir con su desarrollo y de esta forma garantizar y confirmar la eficiencia de la técnica empleada (Albers *et al.*, 1985).

2.10.1 Sensibilidad al pH.

El pH extracelular es uno de los factores capaces de poder controlar los parámetros de movilidad, sin embargo, sus valores óptimos son necesarios, pero no suficientes para las condiciones de activación espermática (Márián *et al.*, 1997). Alteraciones del pH interno interfieren con la movilidad en diferentes especies (Cosson *et al.*, 2000). Por lo tanto, la modificación del pH intracelular por acción del Ca^{2+} y otros componentes son necesarios para el proceso de activación. La movilidad espermática disminuye hasta 0% cuando el pH interno se aproxima a valores de 5.4 y/o 5.0 respectivamente (Ingermnan *et al.*, 2002). Algunos estudios han reportado que el pH extracelular por debajo de 5.5 inhibe completamente la movilidad espermática. La movilidad flagelar depende también del pH intracelular en un rango de 6.5-8.5, por encima o debajo de este rango se reduce significativamente (Ohta *et al.*, 2001).

Unterberger *et al.* (1932) mejoró un método que le permitió deducir que los fluidos seminales muy alcalinos favorecen la sobrevivencia de los EZP's portadores del cromosoma Y, pero si se tiene un medio vaginal muy ácido este va a favorecer a la sobrevivencia de EZP's portadores del cromosoma X.

Este mismo método fue utilizado en conejos por Wakim *et al.* (1972), en donde demostró que la proporción de sexos se puede modificar a través de la variación del pH de la vagina justo en el momento en que ocurra el apareamiento, observando que cuando el pH se encuentra entre 6.5-7.5 prevalece el sexo femenino, y con un pH de 7.5-8.3 se podrían esperar animales de sexo masculino.

2.10.2 Carga eléctrica de la superficie de la membrana.

El potencial membranal activa las señales de transducción y diferenciación en muchas células, mediando respuestas fisiológicas y metabólicas en las células involucradas (Emri *et al.*, 1998). La superficie de la membrana plasmática juega un papel fundamental en la respuesta del EZP's al entorno, otorgándole la capacidad dinámica para regular diferentes actividades celulares y rutas de señalización que conducirán a la activación de la movilidad espermática (Marián *et al.*, 1993).

Al sufrir el choque hiposmótico (generar una señal inicial para los eventos que conducen a la activación de la movilidad flagelar de las células espermáticas) se hiperpolariza la membrana espermática generando una reacción que se traduce en activación de la movilidad de los EZP's, la cual estará mediada por las diferencias de densidad que existe entre EZP's "X" e "Y" (Carlos *et al.*, 2005).

Por medio de electroforesis se ha logrado demostrar que los EZP's poseen carga eléctrica negativa, en los primeros experimentos en conejos los EZP's fueron separados por medio de electroforesis (técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico), se obtuvo un 62% de hembras y 25% de machos de los animales nacidos a partir de la inseminación artificial (Gordon *et al.*, 1957).

2.10.3 Diferencias de la velocidad de migración (Swim-up).

Debido a la diferencia de peso determinada por la cantidad de ADN en EZP's "X" e "Y", es posible separarlos por su diferencia de velocidad de migración, es decir, los EZP's con cromosoma "Y" son más rápidos que los "X". Así mismo, se sabe que aquellos EZP's portadores del cromosoma "Y" después de ser depositados durante el acto sexual en el útero de la hembra serán los primeros en llegar al sitio (curvatura de la trompa de Falopio) donde se llevará a cabo la fecundación del ovocito, por lo tanto, se espera el mismo comportamiento de manera *in vitro* al incubar los EZP's en medio de cultivo.

La técnica de Swim-up la cual fue desarrollada por Parrish *et al.* (1984), se basa en la capacidad migratoria de los EZP's. Éstos son incubados en el fondo de un tubo con medio de cultivo a 39°C por un periodo determinado, en el cual los EZP's con motilidad progresiva rectilínea ascienden a través de la columna de medio. En bovinos Wolf *et al.* (2008) reportaron una proporción de 58.45% en machos y 41.55% en hembras.

Dentro de las ventajas de realizar esta técnica destacan: es fácil de realizar, barata y por lo general se recupera una fracción "limpia" con EZP's de alta motilidad. Sin embargo, también tiene sus limitantes, como son: restringida únicamente para aquellos eyaculados con alta motilidad y concentración espermática, bajo recupero de EZP's sexados y los EZP's pueden ser dañados por la reacción oxidativa, así como también, decrece significativamente el porcentaje normal de cromatina condensada

2.10.4 Diferencias en el contenido de ADN (citometría).

La predeterminación del sexo en la descendencia, utilizando EZP's separados con base a su contenido en ADN, es posible en mamíferos incluido el hombre, gracias a la técnica de citometría de flujo (Johnson *et al.*, 2000). Esta técnica se basa en la diferencia de fluorescencia que emiten los EZP's tras la tinción de su ADN, debido a la variación en la cantidad de ADN que existe entre el cromosoma "X" e "Y" (Johnson *et al.*, 2000). Los EZP's son marcados con un colorante vital fluorescente (Hoechst 33342), este colorante marca específicamente el ADN y la fluorescencia emitida por cada cromosoma es proporcional a su tamaño. Los que poseen el cromosoma "X" emiten una señal mayor que aquellos que poseen un "Y". Los EZP's de las diferentes especies de interés económico en los sistemas de producción han sido separados mediante citometría de flujo en poblaciones X e Y, con purezas alrededor de un 90-95% (Riera *et al.*, 2005).

2.10.5 Diferencias de densidad.

Haciendo uso del conocimiento de las diferencias de densidades entre EZP's "X" e "Y", se exponen estos en gradientes de densidad utilizando Ficoll sodio metrizoato o Percoll y se centrifugan, esperando que el sedimento o la pastilla formada sea rica en concentración de EZP's portadores del cromosoma "X" debido a su mayor densidad y que aquellos portadores del cromosoma "Y" queden en el sobrenadante.

Kaneko *et al.* (1984) observaron en la especie humana que cuando los EZP's fueron colocados en una solución con 76.7% de Percoll y ultracentrifugados a 30000 revoluciones durante 20 minutos, la velocidad de sedimentación del EZP "X" fue mayor que la del EZP Y. En bovinos, Schwiderski *et al.*, (1991) utilizaron una metodología semejante a la reportada por Lizuka *et al.* (1987), y obtuvieron un 74.8% en la separación de los EZP's bovinos portadores del cromosoma X. Wolf *et al.* (2008) reportaron una proporción de 51.35% en hembras y 48.65% en machos utilizando un gradiente de 90 y 45% de Percoll.

Dentro de las ventajas de usar diferencias de densidad para sexar destacan que generalmente se recupera una fracción limpia de EZP's con gran motilidad, EZP's de eyaculados de baja concentración pueden ser utilizados para FIV y se obtienen altos porcentajes de recupero, sin embargo, sus limitantes son: la producción de interfaces de buena relación entre los diferentes medios lleva mayor tiempo y el Percoll no puede ser utilizado para FIV.

2.10.6 Diferencias de densidad con albúmina sérica humana (HSA).

Otra técnica de interés derivada a partir de gradientes de densidad fue introducida en 1973 por Ericsson, quien reportó que se enriquece EZP's "Y" a través del pasaje por gradientes discontinuos de HSA (Philippe *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la presencia de HSA en los procesos de separación de EZP's "X" e "Y" mejora la tasa de fecundación en diversas especies eliminando colesterol y zinc de los EZP's y con ello aumentando sus niveles de movilidad realizando su recorrido hasta llegar al ovocito, además de afectar el nivel de los fosfolípidos de la membrana, permitiéndoles así mayor oportunidad de interactuar con la ZP y poder penetrar y descondensar su material genético en el núcleo del ovocito (Schenk *et al.*, 1999; Maxwell *et al.*, 2004).

Aproximadamente el 85% de los EZP's humanos que migran a través de diferentes gradientes de concentración de HSA tienen cromosoma "Y". Hernández *et al.* (2008) obtuvieron 33 eyaculados de conejos Nueva Zelanda blancos para realizar la separación de EZP's "Y" por medio de diferentes gradientes de densidad (10, 15 y 20%) de HSA. De un total de 30 partos después de la inseminación artificial con EZP's obtenidos de la capa con 20% de HSA, nacieron 187 gazapos, el 72.72% machos y 27.27% hembras. Los resultados indicaron que mediante gradientes de densidad de HSA fue posible realizar la selección de EZP's "Y" en semen de conejo y consecuentemente producir más machos debido a que estos se pueden separar en los gradientes por su menor contenido de cromátida, atravesando más rápido que los portadores del cromosoma "X", hasta llegar al gradiente del 20%.

3.0 Estimación de la fertilidad *in vivo* mediante pruebas *in vitro*.

Las características seminales varían ampliamente entre sementales ovinos como entre eyaculados de un mismo semental, debido a que las condiciones externas que influyen directamente sobre la calidad seminal no se pueden controlar (Clark *et al.*, 1989). Un número importante de factores que influyen en la producción espermática y provocan variaciones en la calidad y en su capacidad fecundante pueden ser: la estación del año en que se extraigan las muestras, debido a que el clima es un factor crítico para la estabilidad de los sementales (Grabner *et al.*, 1986; Galli *et al.*, 1991), el nivel de nutrición, la cual debe encontrarse estable para que se produzcan eyaculados con buena calidad (Colenbrader *et al.*, 1990), la raza (Graham *et al.*, 1986; Gerfen *et al.*, 1994), la edad de los sementales es un parámetro que afecta directamente para calidad, volumen y la cantidad de eyaculados que se puedan obtener de un mismo semental (Larsson *et al.*, 1986) y el estado sanitario en el cual se encuentren (pastoreo o en corral) (Aguilar *et al.*, 2005).

3.1 Análisis de la interacción ovocito-espermatozoide. Sistemas de fecundación *in vitro*.

Actualmente se propone el uso de pruebas *in vitro* que permitan conocer más a fondo el comportamiento y estado funcional de los EZP's después de someterlos a diversos procesos. Los métodos que incluyen el estudio de la interacción con ovocitos vivos pueden proporcionar una información más efectiva de la capacidad fecundante de los EZP's después de ser sometidos a diferentes procesos de separación (Bavister *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 2004), permitiendo predecir con mayor seguridad la eficiencia de cualquier prueba que se desea implementar bajo la evaluación en condiciones *in vitro*. Entre estas pruebas podemos diferenciar los ensayos que miden la unión de los EZP's a la ZP, las pruebas basadas en la fecundación *in vitro* (Pursel *et al.*, 1984; Wolf *et al.*, 2008).

3.2 Prueba de unión a zona pelúcida.

El reconocimiento bioquímico, la unión entre las membranas espermáticas y los receptores de la ZP son pasos necesarios que los EZP's deben sufrir previamente a la penetración del ovocito (Yanagimachi *et al.*, 1981), de manera que la evaluación de los procesos de unión a ZP pueden explicar una fase muy importante del proceso de fecundación *in vitro* y con ello poder evaluar la capacidad fecundante de EZP's al ser sometidos a cualquier proceso de separación. Para ello se exponen los ovocitos a EZP's previamente capacitados y se evalúa mediante conteo el número de EZP's totales fijados o interaccionando sobre esta (valor absoluto) y de esta manera se estima un aproximado del daño que pudo o no causar la técnica de sexado empleado (Jiménez *et al.*, 2004).

3.3 Prueba de fecundación *in vitro* homoespecíficos.

La utilización de ovocitos-espermatozoide homoespecíficos (de la misma especie) en un sistema artificial permite analizar el proceso de fecundación. Por ello, se ha sugerido que sería un método más adecuado para poder predecir la capacidad fecundante de los EZP's (Howard *et al.*, 1991). En los denominados ensayos de penetración se pueden evaluar los procesos de unión y penetración de la ZP, en la que tiene una destacable importancia la hiperactivación de la motilidad. Ésta se produce en el lugar de fecundación y se caracteriza por un patrón de movimiento específico del flagelo, que se traduce en un desplazamiento rápido del EZP's (Wolf *et al.*, 2008).

Este fenómeno está relacionado con diversas funciones entre las que se han descrito el facilitar el encuentro con el ovocito en la luz oviductal, favorecer el paso entre sustancias viscosas, como las secreciones mucosas presentes en el oviducto y la matriz del montículo ováricos de células, y favorecer la penetración de la ZP (Stauss *et al.*, 1995).

La posibilidad de utilizar ovocitos inmaduros permite reducir los costos y el tiempo necesario para llevar a cabo los estudios de fecundación *in vitro*. Mattioli *et al.* (1990) demostraron por primera vez que los ovocitos inmaduros pueden ser penetrados, aunque el EZP que ha penetrado en el ovocito inmaduro es incapaz de descondensar por completo su material nuclear como consecuencia de la inmadurez del citoplasma del ovocito. Esta posibilidad permite plantear la prueba de penetración de ovocitos inmaduros como una vía para evaluar la capacidad fecundante de los EZP's ovinos (Martínez *et al.*, 1993; Matas *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2008).

4. JUSTIFICACIÓN.

La utilización de semen sexado ha permitido a los ganaderos obtener mayores proporciones de machos o hembras según sean sus necesidades productivas, incrementando la mejora genética mediante la selección de los parentales y reduciendo la incidencia de enfermedades genéticas en el ganado, sin embargo, debido a los altos costos y problemas que conllevan las pruebas *in vivo* se ha realizado y se continua realizando un importante esfuerzo en el estudio de la célula espermática con el objetivo principal de encontrar pruebas *in vitro* de fácil realización y de costo reducido que permita predecir la capacidad de fecundación *in vitro* de EZP's después de ser sometidos a separación, por lo cual, en el laboratorio de biotecnología animal de la Universidad Del Papaloapan ha surgido la necesidad de implementar pruebas *in vitro* que permitan evaluar la capacidad fecundante sobre el semen ovino sexado.

5. HIPÓTESIS.

La separación de EZP's ovinos en columnas compuestas de gradientes de albúmina sérica humana no afecta la capacidad fecundante de los EZP's sexados.

6. OBJETIVOS.

6.1 General:

Evaluar la capacidad fecundante mediante pruebas *in vitro* de EZP's ovinos frescos sin sexar y sexados en columnas compuestas de gradientes de albúmina sérica humana.

6.2 Particulares:

1. Evaluar la capacidad fecundante de EZP's ovinos sin sexar bajo prueba *in vitro* de interacción ovocito-espermatozoide.
2. Evaluar la capacidad fecundante de EZP's ovinos sin sexar bajo prueba de penetración *in vitro* homoespecífica.
3. Evaluar la capacidad fecundante de EZP's ovinos sexados del gradiente de 20% bajo prueba *in vitro* de interacción ovocito-espermatozoide.
4. Evaluar la capacidad fecundante de EZP's ovinos sexados del gradiente de 20% bajo prueba de penetración *in vitro* homoespecífica.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Ubicación.

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología animal de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, ubicada en el circuito Central No. 200, Col. Parque Industrial.

7.2 Manejo de semen.

El semen fue extraído de sementales ovinos fértiles del rancho la Oveja Negra ubicado en San Bartolo, sobre carretera federal Loma Bonita-Tuxtepec Oax. La extracción se realizó mediante método de vagina artificial (Anexo, imagen 4 y 5). Se recolectaron muestras en tubos de plástico graduados de 15 mL (Anexo, imagen 6) y se transportaron en un termo a una temperatura de 20°C al laboratorio de Biotecnología animal para alentar metabolismo de los EZP's e impedir que mueran más rápidamente.

Las muestras fueron atemperadas y sometidas en el interior de un baño maría a 37°C durante 20 minutos para reavivar los EZP's. Se realizó un análisis macroscópico midiendo: volumen, viscosidad (se tomó muestra de semen con pipeta Pasteur y se dejó caer una gota, evaluando la longitud de esta en cm), aspecto (presencia o ausencia de grumos) y color.

7.2.1 Análisis microscópico.

7.2.2 Motilidad Pre y Post separación:

La evaluación seminal microscópica se realizó mediante el Sistema de Análisis Computarizado con software ISAS, se tomaron 2 µL de la muestra pura y de gradientes colocándolas en portaobjetos. Se analizaron en un microscopio óptico (UB 200i microscope series, UOP, Proser) con aumento de 10x a ph negativo.

7.2.3 Concentración Pre y Post separación:

Se realizó dilución de 995 μL de agua destilada y 5 μL de semen fresco y sexado (1:200) colocando 10 μL de la dilución en cámara de Newbawer, posteriormente se realizó conteo determinando la concentración total del eyaculado con aumento de 10x en ph positivo en microscopio óptico, con este análisis se determinó la cantidad de semen (μL) que se sometió a las columnas de gradientes de HSA administrando una concentración de 300 millones de EZP's por columna.

7.2.4 Vitalidad Pre y Post separación:

Se empleó la tinción de EZP's con naranja de acridina. Los frotis realizados con semen fresco y sexado diluido en solución salina (100 μl solución salina y 5 μl de semen) y acridina se dejaron 48 horas en solución de ácido acético y metanol, posteriormente se evaluó con fluorescencia el porcentaje de vivos y muertos en microscopio óptico (UB 200i microscope series, UOP, Proser) mediante CASA. Se observan EZP's vivos de color verde y muertos en color rojo.

7.3 Preparación de columnas de HSA.

Las columnas fueron preparadas diluyendo albumina concentrada a 25 % en solución salina para obtener albumina al 10, 15 y 20% en tubos graduados estériles de 15 mL, cada columna estaba compuesta de 1 mL de los tres diferentes gradientes de concentración (10, 15 y 20%) y se sometieron a separación una cantidad de aproximadamente 300 millones de EZP's por columna, se sellaron las columnas con papel aluminio y se incubaron durante 1 h a 37 - 37.5°C (Hernandez *et al.*, 2008) (Anexo, imagen 7).

Transcurrido este tiempo, se realizó la separación de cada gradiente con un intervalo de 10 minutos cada uno, se evaluó nuevamente análisis microscópico a cada gradiente (concentración, motilidad y vitalidad).

7.4 Obtención de los ovocitos.

Los ovarios fueron recolectados en rastro y trasladados al laboratorio de biotecnología animal en solución salina (PBS, Gold Biotechnology USA) atemperada (30-35°C) adicionada con gentamicina (50 µg/mL) y estreptomina (100 µg/mL). Los folículos de 3 a 6 mm de diámetro fueron aspirados con una jeringa de 5 cc y aguja calibre 18g x ½ (Karami *et al.*, 2011).

El líquido folicular fue depositado en tubos eppendorf de 1 mL y se incubaron por 15 min para sedimentación de los ovocitos (Roberto *et al.*, 2008). Posteriormente con micropipeta se recuperó el precipitado y se colocó en una caja de Petri con solución PBS atemperada para la identificación y selección de los ovocitos en metafase I (anexo, imagen 7) con la ayuda de un estereoscopio (Nikon SMZ800N Zoom stereomicrope) y pipeta Pasteur alargada, se realizó bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar.

7.5 Cultivo *in vitro* de ovocitos.

Los ovocitos recuperados en metafase I fueron depositados en cajas Petri con 2 mL de medio de cultivo TCM-199, suplementado con gentamicina (50 µg/mL), estreptomina (100 µg/mL), 10% (v/v) de suero fetal inactivado (56°C/1 hora), gonadotropinas: (5µg LH/mL, 2.5µg FSH/mL) y estradiol (1µg/µL) (Karami *et al.*, 2011). Posteriormente se incubaron en Miri® (ESCO Medical, Miri® Bentsch Multi-room Incubator) durante 20-22 horas a 39°C y 5% de CO₂, transcurrido este tiempo se transfirieron a medio TCM-199 limpio para proseguir con la evaluación de las pruebas de capacidad de fecundación.

7.6 Fertilización *in vitro* de ovocitos con semen fresco y sexado.

Un total de 100 ovocitos se sometieron a FIV con la suspensión de EZP's obtenidos de la fracción del 20% (1µL), se incubaron en cajas petris con 2 mL de medio TCM-199 adicionado con 10% de suero fetal bovino inactivado, gentamicina (50 µg/mL) y estreptomicina (100 µg/mL), e incubados juntos a 37°C bajo humedad controlada y atmosfera condicionada (5% CO₂ en aire) (Roberto *et al.*, 2008). Se realizó el monitoreo del experimento 1 hora después para poder realizar los test de valoración de capacidad fecundante.

De igual manera un total de 100 ovocitos se sometieron a fertilización con semen fresco (capacitado previamente en medio TCM-199 durante 1 h a 37°C) bajo las mismas condiciones de incubación para poder evaluar los tests de capacidad fecundante con EZP's sin sexar.

7.7 Prueba de unión a zona pelúcida.

Se le realizo el test de unión a la ZP con EZP's sin sexar y sexados del gradiente del 20%. Después de 1 hora de incubación de ovocitos con EZP's, se prosiguió a observar en microscopio óptico invertido para realizar conteo y determinar la cantidad de EZP's que estaban interaccionando o en contacto con la ZP de los ovocitos y de esta forma se realizó se hizo el conteo global.

7.8 Prueba de fecundación *in vitro* homoespecífico.

Se realizó la incubación de ovocitos y EZP´s sometidos a pruebas *in vitro* por 12 hrs. Fueron tomados los ovocitos expuestos a FIV con ayuda de pipeta Pasteur, y se colocaron en portaobjetos, se les adiciono una cantidad de 3-4 μ L de naranja de acridina sobre la muestra (6 μ L) y se realizó barrido dejándose secar las tinciones por 12 horas. Transcurrido este tiempo se observó en microscopio óptico a objetivo de 100x cuantos ovocitos habían sido penetrados, tanto con semen sexado del 20% y semen fresco sin sexar, basándonos en el fundamento de observar el núcleo del EZP condesando o en proceso de descondensación dentro del citoplasma del ovocito.

8.0. Análisis estadístico.

Para valoración espermática en los diferentes gradientes de densidad de HSA (10,15 y 20%) se realizó análisis mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey (evaluando medias repetidas entre diferentes tratamientos) con grado de significancia de 0.05, y para capacidad fecundante se usó la prueba de chi cuadrada con grado de significancia de 0.05.. Usando para ambos análisis el programa IBM SPSS Statistics para Windows versión 23.

9.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1 Resultados para semen fresco sin sexar.

Los resultados obtenidos de análisis macroscópico a semen fresco previo a separación en gradientes de HSA se observan en la tabla 2, la evaluación realizada a la muestra presentó características favorables y normales de acuerdo a las establecidas en cuanto a calidad seminal según Ordóñez *et al.* (2005), estas fueron un indicativo directo para poder proseguir con el sexado y las pruebas *in vitro* establecidas.

Tabla 2. Parámetros macroscópicos.

Parámetros macroscópicos	Observación
Color	Blanco crema
Volumen	0.5 mL.
Licuefacción	Muestra normal, homogénea, sin grumos ni coágulos.
Viscosidad	< 2 cm

Se observó buena calidad seminal a pesar del poco volumen obtenido de muestra, todos los parámetros macroscópicos evaluados presentaron características normales.

A pesar de obtener poco volumen en los eyaculados de sementales ovinos fértiles, las condiciones bajo las cuales se encontraban fueron muy favorables, tales como: una buena alimentación, estado sanitario óptimo y la edad, estas se vieron reflejadas sobre la calidad del semen extraído. El volumen obtenido en este estudio resultó ser mucho menor al reportado por otros autores como Gonzales *et al.* (1998) de 1.01 mL en ovinos, pero muy parecido a lo reportado por Fernández *et al.* (2009) y Guillermo *et al.* (2011) que fue de 0.49 y 0.7 mL respectivamente sobre la misma especie, todos usaron el método manual de extracción con vagina artificial, sin embargo, estas variaciones de volúmenes observadas en los diferentes estudios se deben al estado fisiológico de los sementales (edad y alimentación principalmente entre los diferentes sementales).

Por otra parte, concluido el primer análisis macroscópico, se realizó segunda evaluación, observando en la tabla 3 los promedios obtenidos de los datos sobre el análisis seminal en sistema computarizado (concentración, motilidad, vitalidad) al semen fresco antes de haberlo sometido a la separación en columnas de HSA, se obtuvieron valores altos, favorables y aceptables los cuales nos permitieron continuar con la separación en los gradientes de densidad.

Tabla 3. Parámetros microscópicos de semen fresco sin sexar.

Parámetros			
	Concentración (x10⁶/mL)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)
SFSS	3187.56 ± 1.10	96.20 ± 1.08	98.10 ± 1.00

Estos valores fueron tomados como blanco para poder evaluar el comportamiento de los EZP's después de su separación en HSA y de esta forma poder comparar si hay efecto o no durante el sexado.

SFSS: Semen fresco sin sexar

DE: Desviación estándar

La concentración espermática obtenida fue de 3187.56x10⁶/mL que, en comparación con Gonzales *et al.* (1998) quienes reportan una concentración mayor sobre la misma especie siendo esta de 4 x10⁶/mL siendo muy parecida a la reportada por Fernández *et al.* (2009) quienes obtuvieron 4197.26 x10⁶/mL. Por otra parte, Guillermo *et al.* (2011) reportan una concentración de 3843 x10⁶/mL muy parecida a la de este estudio. Cabe mencionar que las diferencias de volúmenes de eyaculados en estas investigaciones sobre la especie ovina fueron de 0.5, 1.01, 0.49 y 0.7 mL respectivamente. A pesar de las diferencias de concentración en comparación con otras investigaciones, los eyaculados obtenidos en este estudio se mantienen en un rango muy aceptable y normal para la especie ovina (Ordóñez *et al.*, 2005).

En cuanto a la motilidad, Gonzales *et al.* (1998) y Fernández *et al.* (2009) reportan valores de 72.85 y 72.83% para semen fresco, muy por debajo de la motilidad que obtuvimos de 96.20% sobre la misma especie, de igual manera Guillermo *et al.* (2011) reportan una motilidad promedio de 88.77%, la cual es más parecida o cercana a la motilidad de este estudio. Estas diferencias evaluadas se deben muy probablemente a la temperatura ambiente alcanzada al momento de la extracción en cada investigación, a factores externos durante la extracción de las muestras seminales y el tiempo en que se procesan, así como la temperatura de transporte y al estado fisiológico del macho: la edad, alimentación y la estación del año, las cuales están más apegadas a la determinación de la calidad seminal, y por ende la obtención de eyaculados con buena concentración espermática y altas motilidades. El porcentaje de vitalidad es alto (98.10%), lo cual nos indica que los eyaculados y los EZP's no se vieron afectados durante el transporte al laboratorio de Biotecnología animal y que se obtuvieron muestras con EZP's en buen estado funcional, el método usado de transporte resulto ser eficiente.

9.2 Resultados para semen sexado en los gradientes de densidad.

Después del sexado de EZP's en HSA se realizó la evaluación mediante el CASA a cada uno de los gradientes de densidad, se muestran en la tabla 4 los promedios de los resultados obtenidos durante análisis microscópico a semen fresco sin sexar comparándolos con semen sexado en albumina obtenido de los tres diferentes gradientes, y así se pudo evaluar si existe algún efecto sobre los EZP's durante la separación en los gradientes de HSA (10, 15 y 20%). Se observa que existe diferencia significativa entre semen fresco y semen sexado para los tres gradientes en los parámetros de motilidad y vitalidad ($p < 0.05$), este comportamiento o diferencia se debe a que la HSA aparte de ser un medio usado para la separación de EZP's, también otorga a los EZP's en buen estado funcional la habilidad de poder aumentar su capacidad fecundante capacitándose durante su nado por el gradiente y prepararse para el momento en que tengan que interaccionar con la ZP de los ovocitos y poder penetrarla, todos aquellos no funcionales se quedan en el primer gradiente.

Tabla 4. Parámetros microscópicos evaluados para semen fresco y semen sexado (motilidad, vitalidad y concentración espermática)

MUESTRAS	PARÁMETROS EVALUADOS		
	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	Concentración (x10 ⁶ /mL)
SFSS	96.20 ± 1.62 ^a	98.10 ± 2.59 ^a	300.00 ± 164.10 ^a
*SS10 HSA	72.20 ± 2.09 ^b	72.20 ± 2.09 ^b	106.3 ± 113.45 ^b
*SS15 HSA	82.20 ± 2.07 ^c	88.30 ± 2.09 ^c	83.77 ± 293.01 ^c
*SS20 HSA	84.20 ± 2.99 ^c	86.10 ± 3.09 ^c	75.19 ± 561.88 ^d

Se observa que en los tres gradientes de densidad sobre los parámetros de motilidad y vitalidad existe diferencia significativa comparándolo con semen fresco sin sexar, entre semen sexado del gradiente del 15 y 20% no existe diferencia estadísticamente significativa para motilidad y vitalidad. Motilidades >50% y vitalidad >70% aún se consideran viable para técnicas de FIV de acuerdo a Luis *et al.* (2010).

a, b, c, d. Literales de la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

DE: Desviación estándar.

*= Albúmina Sérica Humana.

SFSS= Semen fresco sin sexar

*SS10: Semen sexado gradiente del 10%.

*SS15: Semen sexado gradiente del 15%.

*SS20: Semen sexado gradiente del 20%.

Se observan diferencia estadísticamente significativa entre gradientes del 10, 15 y 20%, debido a que en la concentración de HSA del 10% se mantiene la proporción de todos aquellos EZP's con deficiencias que les impiden poder atravesar los gradientes, tales como: inmadurez espermática, no cuentan con movimiento oscilante de la cola para desplazarse o existen EZP's muertos.

Entre los gradientes del 15 y 20 % no existen diferencias significativas para los parámetros de motilidad y vitalidad, era algo de esperarse debido a que en estos gradientes se esperan encontrar únicamente a todos aquellos EZP's vivos con la habilidad de nadar a través de estos gradientes. Para el caso de las diferencias determinadas en el parámetro de concentración, se observa un comportamiento no uniforme, el cual es resultado propio y normal de la separación a través de los gradientes de HSA.

Se observan diferencias con semen sexado en el parámetro de motilidad comparado con Hernández *et al.* (2008) en conejos quien obtuvo porcentajes de 60.15, 45.75 y 35.45% mientras que en este estudio se obtuvieron 72.20, 82.20 y 84.20 % para gradientes de 10, 15 y 20 % respectivamente, con el empleo de semen humano se observaron motilidades muy superiores reportadas por Ericsson *et al.* (1973) quienes trabajando con concentraciones de 10 y 20% de HSA reportan una motilidad progresiva de 75.00 y 95.00%, siendo las motilidades del gradiente de 10% muy parecidas con el semen ovino de este estudio. Otra investigación realizada por Dmowski *et al.* (1979) utilizando solamente 2 capas de HSA con densidades de 10 y 20%, reportaron una motilidad progresiva 64.00 y 77.00%, mientras que Beerninkk *et al.* (1993) utilizando tres diferentes gradientes de HSA (7.5, 12.5 y 20%) encontraron un porcentaje de motilidad progresiva de 80-86% en HSA al 20% siendo esta muy similar a la motilidad en semen ovino sexado. Cabe mencionar que en las evaluaciones con semen humano este fue centrifugado antes de su evaluación para limpiarlo de restos de células de descamación y plasma seminal, ocasionando que la capacidad de los EZP's para llegar a interactuar con la ZP se vea reflejada en el incremento de su motilidad.

Los resultados obtenidos en cada gradiente de concentración espermática sobre las diferentes fracciones de la columna de HSA (10, 15 y 20%) fueron de 106.3, 83.77 y 75.19 $\times 10^6$ mill/mL respectivamente en semen de ovino, trabajando con una concentración inicial en promedio de 300.0 $\times 10^6$ mill/mL sometidos a separación. Hernandez *et al.* (2008) obtuvo en las diferentes fracciones de la columna valores de 504.24, 376.06 y 211.81 $\times 10^6$ mill/mL con una concentración espermática inicial de 773.36 $\times 10^6$ mill/mL. No es posible realizar una comparación como tal en las diferencias de concentración de cada gradiente de concentración respecto al semen fresco y semen sexado en otras investigaciones debido a que el factor “concentración de EZP’s con cromosoma X e Y”, no se puede saber o determinar en el eyaculado antes de la separación y sobre la separación.

Trabajando con semen humano Dmowski *et al.* (1979) usando 2 capas de HSA con densidades de 10 y 20%, reportaron una concentración espermática de 65.00 y 16.00 $\times 10^6$ mill/mL respectivamente siendo la concentración inicial de 395 $\times 10^6$ mill/mL, Beernink *et al.* (1993) determinaron en semen humano una concentración espermática en la capa de HSA al 20% de solo 14 $\times 10^6$ mill/mL, siendo la concentración inicial de separación de 220 $\times 10^6$ mill/mL. La concentración de EZP’s es predominante en todas las investigaciones reportadas para el gradiente de 10%, en donde muy probablemente se encuentran todos aquellos EZP’s muertos y anormales con problemas de motilidad que no tienen la capacidad de atravesar los gradientes de densidad debido probablemente a problemas morfológicos impidiéndole moverse de forma correcta para avanzar por los gradientes.

El tiempo que nos tardamos en realizar los análisis macroscópicos, microscópicos y la preparación de las columnas con los 3 gradientes de HSA, también pueden ser factores importantes que influyan directamente sobre la disminución de la homeostasis de los EZP’s y como consecuencia se observan estas diferencias en los resultados.

9.3 Resultados para pruebas *in vitro* de capacidad fecundante.

Terminado el análisis microscópico para los gradientes de densidad de HSA (10, 15 y 20%) y observando que se obtuvieron buenos resultados después del sexado, se tomaron únicamente los gradientes del 20% para las pruebas *in vitro* de capacidad fecundante. Se muestran en la tabla 5, la cantidad promedio de EZP's sin sexar y sexados del gradiente del 20% contados que logran interaccionar y penetrar los ovocitos, cabe mencionar que se sometió una concentración aproximada de 10000 EZP's a pruebas, se observa que no existe diferencia significativa para ambas pruebas ($p > 0.05$, $0.384 > 0.05$).

Tabla 5. Prueba de interacción con ZP y de penetración.

Pruebas <i>In vitro</i>				
Tipo de semen	# EZP's	# Ovocitos.	# EZP's en ZP.	# Ovocitos penetrados (%).
SFSS	10000	100	>1000 ^a	90 ± 2.0 ^a
SS20	10000	100	>1000 ^a	87 ± 2.4 ^a

Se observan resultados muy parecidos con el semen sin sexar y semen del gradiente del 20% para ambas pruebas de capacidad fecundante, la variación evaluada no resulto ser estadísticamente significativa entre las pruebas *in vitro* ($p > 0.05$).

a. Literal de la misma fila indican si existe diferencia significativa ($p > 0.05$).

DE: Desviación estándar.

SFSS: Semen fresco sin sexar.

SS20: Semen sexado del gradiente del 20%.

Se observa una disminución en el número de ovocitos penetrados con EZP's provenientes de semen fresco y semen sexado del 20% (90 vs 87), esta variación se debe a que desde el inicio antes del sexado y después de este con las evaluaciones realizadas, se obtuvieron diferencias en los parámetros microscópicos evaluados (motilidad y vitalidad), mismas que determinaron una disminución de motilidad y vitalidad en comparación con el semen fresco antes de iniciar la 1^{er} prueba de capacidad fecundante entre los dos tipos de semen, dichas diferencias o disminuciones influyeron también en el resultado de la variación de ovocitos penetrados en la 2^{da} prueba *in vitro*.

A pesar de haber seleccionado ovocitos en buen estado fisiológico, no es un indicativo directo que nos garantice que la calidad ovocitaria usada durante las pruebas *in vitro* nos ofrecería la seguridad de que los EZP's pudieran interaccionar normalmente sin tener complicaciones y activar su reacción acrosómica al contacto con él ovocito, sin embargo, este es uno de los factores que no se controlan totalmente en este estudio. Por lo cual también se considera que, aunque los EZP's cuenten con la capacidad de interaccionar con las zonas pelúcidas de los ovocitos, si estos no desencadenan las reacciones bioquímicas necesarias para los EZP's, estos no podrán penetrar nunca la ZP por más capacitados que se encuentren.

En la figura 3 se observa el núcleo del EZP en proceso de descondensación dentro del citoplasma ya eclosionado de ovocitos inmaduros en metafase I teñidos.

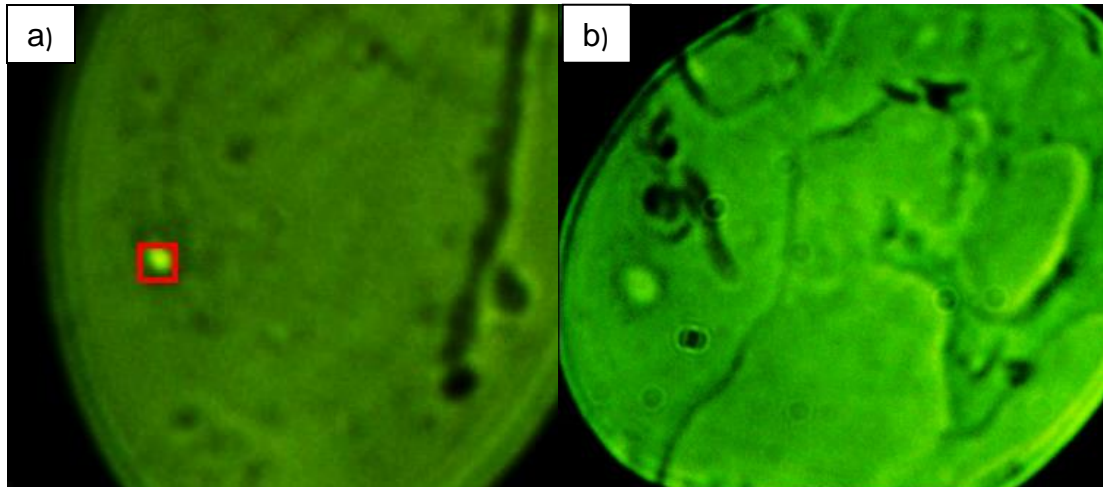


Figura 3. Ovocitos penetrados. Imagen tomada en microscopio óptico con fluorescencia a 100x. a) Se observa el núcleo de EZP de color blanco dentro del citoplasma, la línea color negra observada es resultado de la ruptura del citoplasma con el cubreobjetos cuando se realizó la tinción. b) Se observa el núcleo en proceso de descondensación del EZP dentro del ovocito eclosionado probablemente por la presión realizada con cubreobjetos.

En la primer prueba de interacción con ZP sobre la especie ovina en este estudio, el porcentaje de EZP's en contacto con la ZP para semen sexado en HSA del gradiente del 20% y semen fresco sin sexar fue de 15 a 20% (>1000) aproximadamente alrededor de ZP, por otro lado, se encontró reportado un 9.4% de EZP's contados adheridos a la ZP para Jiménez *et al.*, (2004) evaluando esta prueba *in vitro* con EZP's "Y" seleccionados mediante técnica de separación en swim up (velocidad de migración, nado hacia arriba) usando ovocitos inmaduros al igual que en nuestro estudio. Así mismo, Martínez *et al.* (1993) obtuvo un total de 7.74% de EZP's fijados a la ZP de ovocitos inmaduros los cuales previamente fueron expuestos en diferentes medios de maduración para la especie de jabalí, dichos resultados en estudios de jabalí resultan estar por debajo para la especie ovina en ambos casos, sin embargo, los EZP's en estos estudios no fueron sometidos al mismo proceso y es el motivo por el cual se observan estas diferencias.

En la prueba *in vitro* de penetración homoespecífica se contó un total de 90% de ovocitos fertilizados con semen fresco sin sexar contra 87 ovocitos fertilizados con semen del gradiente del 20% de HSA, dichos resultados son muy altos y no difieren entre si.

Con semen fresco se contaron un 90% de ovocitos penetrados, que en comparación con Martínez *et al.* (1993) en jabalí donde estudiaron el efecto de penetración con ovocitos inmaduros reportaron un 88.82%. de ovocitos penetrados con semen fresco, ambos resultados para las diferentes especies suelen ser muy parecidos en el porcentaje de penetración. En otros estudios, Gadea *et al.* (1998) obtuvieron también evaluando esta prueba en Jabalí un 84,72% de penetración con semen puro de sementales considerados de alta fertilidad (>80%). Muy por debajo de este estudio, Iritani *et al.* (1978) reportaron un 26,4% de ovocitos penetrados con semen sin sexar realizado en jabalí, pero con EZP's epididimales preincubados.

La correlación entre la fertilidad y los resultados de estas pruebas *in vitro* para capacidad fecundante en columnas de HSA ha sido estudiada en un número muy reducido de trabajos y especies, aun se plantean poder realizar más pruebas para especies de interés productivo y con ello evaluar a gran medida la escala de eficiencia del sexado.

10.0 CONCLUSIONES.

El método de sexado de EZP's ovinos en gradientes de densidad con HSA no afecta la capacidad fecundante de los EZP's, no se obtuvieron diferencias significativas sobre la prueba *in vitro* de interacción con zona pelúcida comparando semen fresco contra semen sexado.

Así mismo, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre prueba de penetración *in vitro* homoespecífica, por lo tanto, la técnica de sexado en HSA no es invasiva, aparte de ser poco costosa y de fácil realización en el laboratorio.

11.0 PERSPECTIVAS.

Obtener embriones que sigan con su desarrollo y poder transferirlos a una hembra receptora fisiológicamente estable, esperar a que las crías nazcan completamente sanas y con esto determinar por completo que la capacidad fecundante no ha sido alterada en los EZP's sexados en HSA y por lo tanto no habrá repercusiones en las crías.

Falta mucho terreno por recorrer en el campo de la investigación sobre los mecanismos de otras técnicas de sexado y sus efectos sobre los EZP's, aún quedan infinidad de factores por estudiar, los cuales permitirán aclarar conceptos y de esta forma intervenir de forma segura en el campo de la investigación y la producción sobre el sector ganadero del país.

12.0 ANEXO.



Figura 4. Extracción de semen a sementales fértiles. Se observa el proceso de extracción de semen mediante monta natural a sementales entrenados usando vagina artificial y una borrega en celo para estimular la monta.



Figura 5. Vagina artificial montada. Se observan las partes que constituyen la vagina artificial lista para comenzar la extracción de semen.



Figura 6. Recolección de muestra en tubo de plástico graduado estéril de 15 mL.

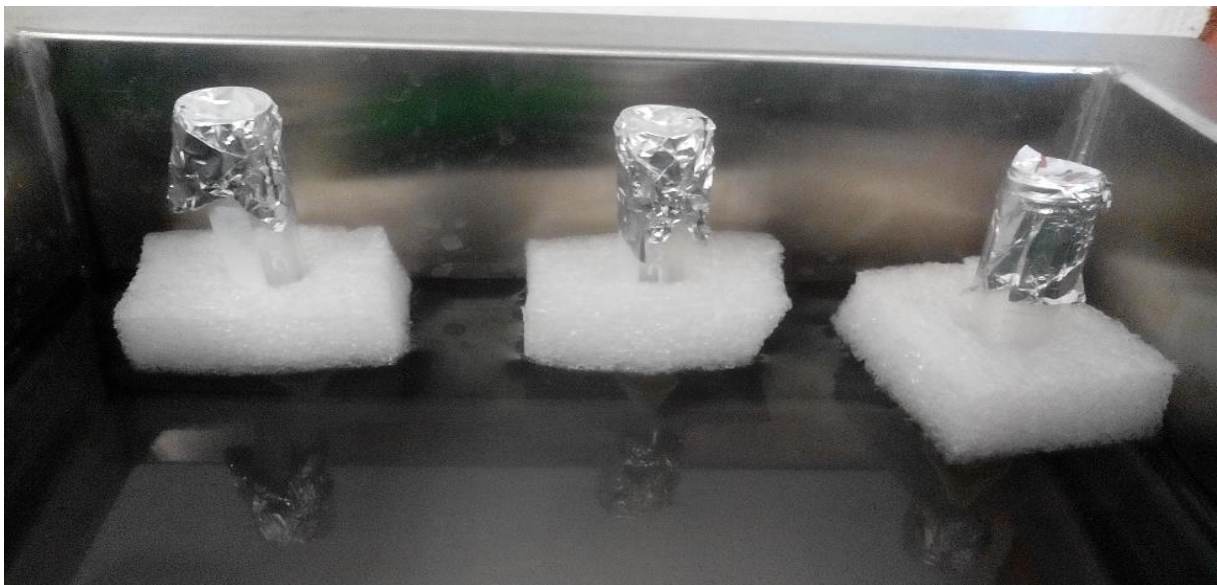


Figura 7. Incubación de semen para separación en gradientes de HSA dentro de tubos graduados estériles de plástico (15mL).

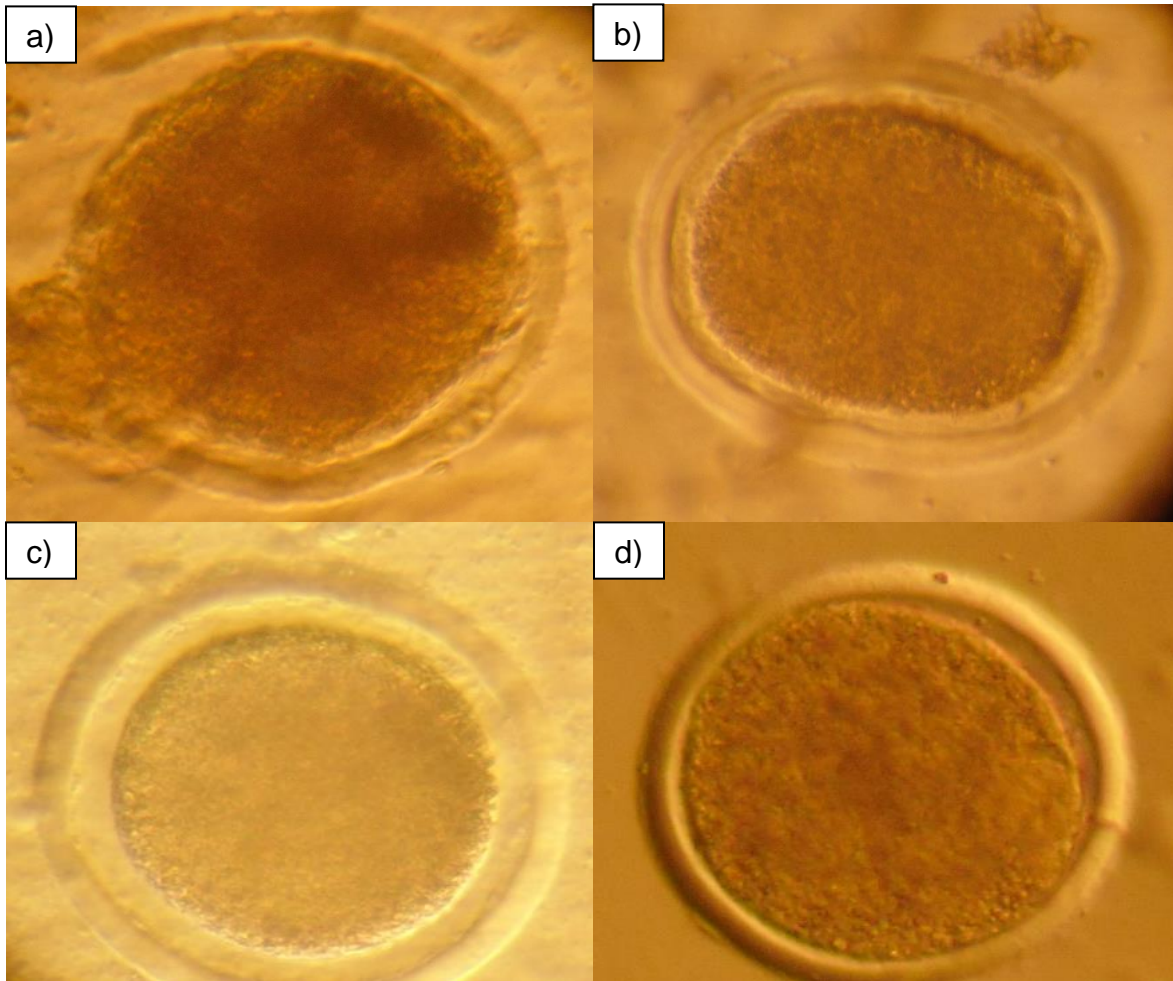


Figura 8. Ovocitos seleccionados para pruebas *in vitro*. Fotografía tomada en microscopio óptico a aumento de 20x a ovocitos seleccionados en estereoscopio. a) Ovocito con ruptura de membrana plasmática y citoplasma comenzando proceso de degradación. b) Ovocito en metafase I, forma alargada y citoplasma sin degradación, se observan células del cumulo al rededor. c) Ovocito en metafase I con un gran espacio previtelino, muy buena definición de citoplasma y membrana plasmática, casi a punto de entrar a metafase II. d) Ovocito metafase I, comenzando expansión para desarrollar espacio previtelino, citoplasma y membrana bien definidos. Ovocitos en metafase I como el b), c) y d) fueron seleccionados para evaluar pruebas *in vitro* de capacidad fecundante.

13.0 BIBLIOGRAFÍA.

1. American Sheep Industry Association. (2002). Sheep Production Handbook. 7^{ma} ed. USA.
2. Aurich C. (2008). Recent advances in cooled semen technology. Anim Reprod Sci 107: 268-275.
3. Aalbers J., Johnson L., Aalberts E., Radmaker J. (1985). ATP content of fresh and frozen-thawed boar semen and its relationship to sperm concentration and fertility. 259-264.
4. Andaur M, Santiani A, Sepúlveda N. (2004). Concentraciones plásmaticas de testosterona máxima en carneros con respuesta a la aplicación de GnRH. En: II Reunión Anual de la Sociedad de Andrología y Gametología de Chile. Temuco.
5. Aisen E. Recolección y evaluación de semen. (2004). Reproducción Ovina y Caprina. 1^{era} ed. Buenos Aires: Inter-Médica.
6. Bavister B. (1990). Test of sperm fertilizing ability. En: Gamete Physiology. Asch, R.H., Balmaceda J.P., Johnston, I., ed. Norwell, Massachusetts: Serono Symposia, USA. 77-105.
7. Balla E., Tríbulo H., Barberis F., Tríbulo R., Barberis S., Reano I., Martínez M. (2007). Utilización de semen sexado en protocolos de superestimulación en vacas Holstein. Resúmenes del VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC, Córdoba (Argentina). 287.

8. Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. 5: 110.
9. Berger T. (1996). Fertilization in ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 351-360.
10. Bergert T., Horton M. (1988). Evaluation of assay conditions for the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res.* 19: 101-111.
11. Bergert T., Parker K. (1989). Modification of the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *Gamete Res.* 22: 385-397.
12. Beernink F., Dmowski W., Ericsson R. (1993): Sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertil. Steril.* 59: 382-386.
13. Brito F., Valencia M., Balcázar S., Angulo M., Mejía V. (2003). Congelación de semen de carnero en pellets con los diluyentes Tris-glucosa-yema de huevo o Lactosa-yema de huevo. *Avances en Investigación Agropecuaria.* 8-2.
14. Bosco A., Scuota S., Castellini C., Cenci T. (1996): Study of an artificial vagina to reduce the microbial contamination of rabbit semen. *World Rabbit Sci.* 4: 201-204.
15. Cardona M., Cadavid J. (2005). Complementariedad intergamentos. *Arch. Esp. Urol.* 57: 1107.

16. Castellini C., Lattaioli P. (1999). Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* 57: 111-120.
17. Castro M., Vicente J. (1996). A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. *Anim. Reprod. Sci.* 44: 195-201.
18. Clark L., Schinckel A., Singleton L., Einstein M., Teclaw R. (1989). Use of farrowing rate as a measure of fertility of boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194: 239-243.
19. Chegaray T., Olvera C., Salcedo B., Mendoza A. (2004). Quality and fertility of preserved rabbit semen at 15°C, in gelatin supplemented extender. *The journal of applied rabbit research cuni-sciences. World Rabbit Sci. 8th World Congress. Puebla-México.*
20. Colenbrander B., Kemp B. (1990). Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 40: 105-115.
21. Cormier N., Sirard M., Bailey L., (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by criopreservation. *J. Androl.* 18: 461-467.
22. Coy P., Martínez E., Ruiz S., Vázquez J., Roca J., Matas C. (1993). Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation in vitro in pigs. *Theriogenology* 40: 539-546.
23. Cosson J., Linhart O., Mims S., Shelton W., Rodina M. (200). Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose surgeon spermatozoa. *J Fish Biol.* 56: 1348- 1367

24. Donnell L., Meachem S., Stanton P. (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. 3^{era} ed. St Louis, USA: Academic Press.
25. Dmowski W., Gaynor L., Rao R., Lawrence M., Scommegna A. (1979). Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. *Fertil. Steril.* 31: 52-57.
26. Ericsson R., Langevin C., Nishino M. (1973). Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature.* 246: 421-424.
27. Foxcroft G., Xu X., Seth P., Harbison D., Cheung A. (1995). Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology.* 53: 212.
28. Finzi A., Morera P., Kuzminsky G. (1995). Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. *World Rabbit Sci.* 3: 157-161.
29. Garner D. (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm, *Theriogenology* 65: 943-957.
30. Gadea J., Matás C. (2000). Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology.* 54, 1343-1357.
31. Graham E., Schemhl M., Nelson D. (1980). Problems with laboratory assays 8th NAAB, conf. A.I Reprod 8: 15-16.
32. Gallia B. (1988). Quality of semen stored at +15/16 °C is related to fertility of artificially inseminated swine. *Theriogenology* 30: 1185-1190

33. Garnel D., Dobrinsky J., Welch G., Johnson L. (1996). Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology* 45: 1103-1113.
34. Graham E., Schmehl M., Nelson D. (1980). Problems with laboratory assays. 8th NAAB Tech. Conf. A.I. Reprod. 1-8.
35. Gadella B., Rathi R., Brouwers J., Colenbrander B. (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*. 68: 249-265.
36. Gerfer R., White B., Cotta M., Wheeler M. (1994). Comparison of the semen characteristics of Fengjing, Meishan and Yorkshire boars. *Theriogenology* 41: 461-469.
37. Gallia A., Bosisio M. (1988). Quality of semen stored at +15/16 °C is related to fertility of artificially inseminated swine. *Theriogenology* 30: 1185-1190.
38. Gerfen R., White B., Cotta M., Wheeler M. (1994). Comparison of the semen characteristics of Fengjing, Meishan and Yorkshire boars. *Theriogenology* 41: 461-469.
39. Gibbons A., Cueto M., Wolff M., Arrigo J., García J. (2004). Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. *Comunicación técnica PA 200*. INTA. EEA Bariloche, Chile.
40. Gordon M. (1957). Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa. *Proc Nat Acad Sci* 43: 913-918.

41. Howard J., Bush M., Wildt D. (1991). Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona free hamster ova and cat zonae pellucidae. 12: 36-45.
42. Hafez E., Jainudeen M., Rosnina Y. (2002). Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: Hafez E y Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domésticos. 7° edición. México. Interamericana-McGraw Hill. 33-55.
43. Holt C., Holt W., Moore H., Reed H., Curnock R. (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on farm inseminations: Results of two fertility trials. J. Andrology 18: 312-323.
44. Ingerman R., Holcomb M., Robinson M., Cloud J. (2002). Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). J Exp Biol. 205:2885-2890.
45. Johnson L. (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art. Animal Reproduction Science 60: 93-107.
46. Johnson L., James P., Harold W. (1989). Sex Preselection in Rabbits: Live Births from X and Y Sperm Separated by DNA and Cell Sorting. Biology of Reproduction 41: 199-203.
47. Lizuka R., Kaneko S., Aoki R., Kobayashi T. (1987) Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application. Human Reproduction: 2: 573-575.

48. Máriań T., Krasznai Z., Balkay L., Balázs M., Emri M. (1993). Hypo-osmotic shock induces an osmolalitydependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *J Histochem and Cytochem.* 41: 291-197.
49. Máriań T., Krasznai Z., Balkay L., Emri M., Trón L. (1997). Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺ / H⁺ exchanger. *Cytometry.* 27: 374-382
50. Matas C., Martínez E., Vásquez J., Roca J., Gadea J. (1996). In vitro penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology* 46: 503-513.
51. Maxwell W., Evans G., Hollinshead F., Bathgate R., Graaf S., Eriksson B., Gillan L., Morton, K.M., Brien, J. (2004). Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 79-95.
52. Martinez E., Ruiz S., Sebastian J., Sánchez R., García C., Martin S. (1986). Factores que afectan a la inseminación artificial porcina. 2: 115-120.
53. Mattioli M., Galeati G., Seren E. (1990). Use of stored zonae pellucidae for the assessment of the fertilizing capacity of boar sperm. 48.
54. Merino G. (2003). Estudios preliminares en capacitación in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados (tesis de Licenciatura). Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile.
55. McClure R., Tom R. (1991). Human sperm hypo-osmotic swelling test: Relationship to sperm fertilizing ability. *Int. J. Fertil.* 36: 360-366.

56. Mortimer D.; Camenzind A. (1989): "The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro". Hum. Reprod 4: 169.
57. Nervo T. (2005): Características medias del eyaculado del conejo tras una recogida del semen semanal. Cunicultura. 30: 173-174.
58. Ordoñez H., Miguel T., Monforte D. (2005): Análisis del semen ovino. Tecnología agroalimentaria. 39-43.
59. Palma G. (2001). Biotecnología de la Reproducción. Argentina, El Paraíso, primera edición, 2001: 318-385.
60. Parrish J., Susko P., First, N. (1984). Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. Biol. Reproduction 32: 112
61. Philpott M. (1993). The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. Br. vet. J. 149: 339-369.
62. Pursel V., Rexexroad C., Wall R. (1984). Relationship of competitive fertility to quality of boar semen. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. 2: 63-65.
63. Rivera P. (2005). Avances de la técnica de preselección del sexo en el ganado porcino mediante separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo. Universidad de Murcia.

64. Ross A., Robinson J., Evans H. (1975): Failure to confirm separation of X and Y bearing human sperm using BSA gradients. *Nature*. 253: 354-355.
65. Schenk J., Suh T., Seidel G. (1999). Cryopreservation of bovine spermatozoa sexed by flow cytometry/cell sorting. *Theriogenology* 52: 1372- 1391.
66. Sharpe M. Regulation of spermatogenesis (1994). In: KNOBIL E, NEIL J. *The Physiology of Reproduction*. New York, USA: Raven Press Ltd. 1363 -1434.
67. Strzezek J., Skaweta R. (1984). Application of chosen biochemical indexes for biological quality of boar semen stored at 15-18 C. 10th Int. Congr. Anim. Reprod., Urbana. 2: 67-69.
68. Stauss C., Votta T., Suárez S. (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* 53: 1280- 1285.
69. Sutovsky P, Manandhar G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: De Jonge C. and Barrat C. *The Sperm Cell*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1-30.
70. Tabares J., Tarazona M., Olivera M. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 4-10.
71. Unterberger F. (1932). Sex determination and hydrogen ion concentration. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 58: 729-731
72. Walkin P. (1972). Determining the sex of baby rabbits by ascertaining the pH of the vagina of the mother before mating. *Osteopath Assoc.* 72: 173.

73. Waberski D., Medings S., Dirksen G., Weitze K., Leiding C., Hahn R. (1994). Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the seme, *Anim. Reprod. Sci.* 36: 145-151.
74. Woelders H. (1991). Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. En: *Boar semen preservation II*. Ed. Johnson L.A., Rath, D. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 145-164.
75. Xu X., Ding J., Seth P.C., Harbison D., Foxcroft G. (1996). In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology* 45: 745-755.
76. Yanagimachi R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2: 371-372.