



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

MODIFICACIÓN A LA TÉCNICA COLUMNAS DE ALBÚMINA PARA EL SEXADO DE SEMEN OVINO

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

PAMELA SEMIRAMIS FLORES MIRANDA

Bajo la supervisión de: RAYMUNDO RANGEL SANTOS, Ph.D.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Junio 2011

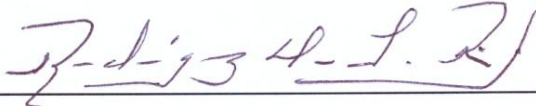
Chapingo, Estado de México

MODIFICACIÓN A LA TÉCNICA COLUMNAS DE ALBÚMINA PARA EL
SEXADO DE SEMEN OVINO

Tesis realizada por **PAMELA SEMIRAMIS FLORES MIRANDA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: 
Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: 
Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESOR: 
Dr. DEMETRIO AMBRIZ GARCÍA

CONTENIDO

CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS	v
DEDICATORIAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
DATOS BIOGRÁFICOS	viii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Preselección del sexo mediante separación espermática	3
2.2 Métodos de separación espermática	5
2.2.1 Citometría de flujo	5
2.2.2 Columnas de albúmina	6
2.2.3 Centrifugación en gradientes de densidad	8
2.2.4 Motilidad y separación por electroforesis	8
2.3 Determinación del sexo por citometría de flujo	9
2.4 Medición de la movilidad espermática	10
2.5 Factores que afectan a los espermatozoides durante el proceso de sexado	12
2.6 Factores que afectan fertilidad y prolificidad en hembras inseminadas con semen sexado	13
2.6.1 Fertilidad	13
2.6.2 Prolificidad	15
2.7 Literatura citada	15

3. TÉCNICA COLUMNAS DE ALBÚMINA PARA SEXAR SEMEN DE CARNERO	21
3.1 Resumen	21
3.2 Abstract.....	22
3.3 Introducción	23
3.4 Materiales y métodos.....	24
3.4.1 Experimento de campo	24
3.4.2 Ensayos de laboratorio.....	27
3.5 Resultados y discusión	29
3.5.1 Resultados de campo.....	29
3.5.2 Resultados de laboratorio	33
3.6 Conclusión	40
3.7 Agradecimientos	41
3.8 Literatura citada	41

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Diferencias entre los espermatozoides portadores de los cromosomas sexuales X y Y como propuesta para la separación espermática.	4
Cuadro 2. Parámetros de motilidad evaluados mediante CASA.....	11
Cuadro 3. Porcentaje de gestación ^z en ovejas Criollas inseminadas con diferentes tipos de espermatozoides (tratamientos).	29
Cuadro 4. Proporción de sexos ^z al nacimiento de crías Criollas al inseminar con diferentes tipos de espermatozoides (tratamientos).....	30
Cuadro 5. Peso al nacimiento ^z de corderos Criollos obtenidos mediante diferentes tipos de espermatozoides (tratamientos).	32
Cuadro 6. Prolificidad ^z en ovejas Criollas inseminadas con diferentes tipos de espermatozoides (tratamientos).....	33
Cuadro 7. Características seminales y patrón de movimiento espermático al variar la concentración de hSA ($\bar{x} \pm EE$).	34
Cuadro 8. Medias ^z para características seminales de cada fracción en la columna de hSA al variar la concentración de hSA.	35
Cuadro 9. Medias ^z para patrón de movimiento espermático de cada fracción en la columna de hSA al variar la concentración de hSA.	39

DEDICATORIAS

A mi mamá Ana María, gracias por todo.

A mis hermanas Cecilia y Nanyuki, gracias por existir. A mi nenita, por tu fidelidad.

A mis mejores amigas: Miriam, por tu amistad incondicional; y Liliana, por tu sinceridad.

A Paul, por brindarme tu apoyo profesional y personal.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para estudiar la Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Producción Animal por brindarme la oportunidad y el apoyo para realizar estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por las facilidades otorgadas para llevar a cabo esta tesis.

Al Ph.D. Raymundo Rangel Santos por su dirección, enseñanzas, apoyo y comprensión que me permitieron culminar esta tesis.

Al Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara por compartir sus conocimientos y apoyo para la realización de esta tesis, y por brindarme su amistad.

Al Dr. Demetrio Ambriz García por su amistad, enseñanzas, tiempo y empeño en la realización de esta tesis.

A la Dra. Edith Arenas Ríos por su tiempo y colaboración en la implementación de metodologías.

A todos los colegas que me brindaron su apoyo para cumplir mis objetivos.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Pamela Semiramis Flores Miranda
Fecha de nacimiento	10 de diciembre de 1984
Lugar de nacimiento	Distrito Federal, México
CURP	FOMP841210MDFLRM05
Profesión	Ingeniero Agrónomo especialista en Zootecnia
Cédula profesional	6166546

Desarrollo académico

Bachillerato	Escuela Nacional Preparatoria no. 5 “José Vasconcelos”
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo
Maestría	Universidad Autónoma Chapingo

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La posibilidad de elegir el sexo de la descendencia antes de la concepción es uno de los objetivos más buscados en el campo de la reproducción animal, ya que es importante por sus repercusiones genéticas y económicas en la producción (Seidel, 2003). Algunas de las ventajas que la elección del sexo puede aportar a las explotaciones ganaderas incluyen la aceleración en los programas de mejora genética, un incremento en la eficiencia biológica y económica de la producción, y una mayor flexibilidad en los sistemas de manejo (Maxwell *et al.*, 2004).

La preselección del sexo mediante separación espermática aplicada a una explotación comercial se define según el objetivo de producción. Por ejemplo, en unidades de producción de pie de cría o lecheras, interesa tener una gran cantidad de hembras, mientras que en donde los animales se destinan para el abasto interesan los machos. Actualmente, la citometría de flujo es una técnica de preselección del sexo con una confiabilidad de 90 a 95% hacia el sexo deseado (Cran, 2003) pero a un costo elevado, por lo que una alternativa es implementar la técnica columnas de albúmina.

La técnica columnas de albúmina separa las células espermáticas de acuerdo con el cromosoma sexual que portan, estratificándolas en un gradiente con dos soluciones de albúmina sérica humana de diferente concentración. Esta técnica es aplicada en reproducción humana asistida con una confiabilidad de 70 a 80% (Beernink y Ericsson, 1982) para obtener el sexo deseado. En ovinos se reporta 84% de confiabilidad sólo en la preselección de sexo para machos (Flores *et al.*, 2007), por lo que debido a los bajos costos y fácil acceso a esta metodología se pretende evaluar el efecto de modificar la concentración de una de las soluciones de albúmina para producir hembras.

En el capítulo revisión de literatura se presenta un análisis de las metodologías empleadas para preselección del sexo, cómo se puede determinar el sexo

mediante citometría de flujo, la importancia de la movilidad espermática, y factores que influyen en la viabilidad de las células espermáticas y en la fertilidad de hembras inseminadas con semen sexado.

En el capítulo técnica columnas de albúmina para sexar semen de carnero se presenta un artículo científico derivado del trabajo de tesis.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Los gametos (ovocito y espermatozoide) son células haploides que contienen los cromosomas sexuales X o Y. Las células somáticas (diploides) de las hembras contienen un par de cromosomas X, en tanto que las células de los machos tienen los cromosomas sexuales X y Y (Hafez y Hafez, 2000). La probabilidad de que un espermatozoide con cromosoma sexual X o Y fecunde a un ovocito en el oviducto es 50%, por lo que se espera al nacimiento una proporción 50% hembras y 50% machos; lo cual puede modificarse utilizando distintas metodologías para el sexado de semen.

2.1 Preselección del sexo mediante separación espermática

El método más eficiente y potencialmente rentable para preseleccionar el sexo de la descendencia, es la separación de los espermatozoides en función de la presencia del cromosoma sexual X o Y, y su posterior utilización mediante técnicas de reproducción asistida (Johnson, 2000).

Las diversas técnicas de separación espermática deben cumplir las siguientes premisas: producir una desviación evidente de espermatozoides portadores de los cromosomas sexuales X y Y de una población espermática, no interferir en la capacidad fecundante *in vivo* o *in vitro* de los espermatozoides separados, y dar lugar a la obtención de descendencia viva que confirme la desviación de la proporción de espermatozoides portadores de los cromosomas sexuales X y Y hacia uno u otro lado (Jafar y Flint, 1996).

La posibilidad de diferenciar los espermatozoides en función del cromosoma sexual que portan se demostró mediante la observación de los cariotipos de diferentes especies de mamíferos, donde encontraron diferencias evidentes en la cantidad de ADN entre los espermatozoides portadores del cromosoma sexual X y Y (Moruzzi, 1979). Esta diferencia se debe al mayor tamaño que presenta el cromosoma X en relación al Y, y es la única diferencia cuantificable

y válida desde un punto de vista científico como base para la separación efectiva de los espermatozoides X y Y (Johnson, 1995).

En el Cuadro 1 se presentan algunos parámetros que diferencian a los espermatozoides X y Y, los cuales han dado pie a proponer diversos métodos para la separación espermática; sin embargo, no se ha podido comprobar la efectividad de estas técnicas a excepción de la diferencia entre el contenido de ADN (Johnson, 1988; Aleahmad *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Diferencias entre los espermatozoides portadores de los cromosomas sexuales X y Y como propuesta para la separación espermática.

Parámetro	Diferencia entre X y Y	Fuente
ADN	Mayor contenido en el espermatozoide X	Cran <i>et al.</i> , 1995.
Tamaño	Mayor tamaño del espermatozoide X	van Munster, 2002.
Motilidad	Mayor rapidez del espermatozoide Y	Ollero <i>et al.</i> , 2000.
Carga superficial	Espermatozoides X migran al cátodo	Mohri <i>et al.</i> , 1987.
Superficie del espermatozoide	Existencia del antígeno H-Y en espermatozoides Y	Howes <i>et al.</i> , 1997.
	Presencia de una proteína específica del sexo (sex specific protein, SSPs)	Blecher <i>et al.</i> , 1999.
F-body	Brazo largo del cromosoma Y	Barlow y Vosa, 1970.

2.2 Métodos de separación espermática

2.2.1 Citometría de flujo

La citometría de flujo es actualmente un método confiable y eficaz para llevar a cabo la separación espermática y obtener descendencia del sexo deseado (Maxwell *et al.*, 2004). Esta técnica se basa en la diferente fluorescencia que emiten los espermatozoides debido a la diferente cantidad de ADN que existe entre el cromosoma X y Y (Vázquez *et al.*, 2001).

El proceso de sexado (Johnson y Welch, 1999) consiste en teñir el ADN de los espermatozoides con el fluorocromo Hoechst 33342, posteriormente se someten al citómetro para discriminar las poblaciones (X o Y) con base en la cantidad de ADN que presenten. Los resultados de fluorescencia son analizados mediante programas informáticos y se representan en forma de poblaciones obedeciendo a sus características de fluorescencia. Después se divide la muestra en microgotas, en cada una de ellas hay un espermatozoide, y pasa por unos circuitos que cargan positivamente a los espermatozoides X y negativamente a los Y; las microgotas son atraídas al polo negativo y positivo, respectivamente, donde son colectadas en un tubo para obtener poblaciones de espermatozoides X y Y por separado.

Las diferencias en el contenido de ADN entre los espermatozoides portadores del cromosoma sexual X y Y de distintas especies son: 3.8% en bovinos, 3.6% en caprinos y porcinos, 3.0% en conejos, 3.9% en perros, 7.5% en chinchillas y, 2.8% en humanos (Johnson y Welch, 1999).

El uso de la citometría de flujo para la separación espermática en especies de interés zootécnico genera purezas de alrededor de 90 a 95% en poblaciones de espermatozoides X y Y (Cran *et al.*, 1993). La obtención de animales del sexo deseado de manera consistente en diferentes laboratorios, confirma la utilidad de la citometría de flujo como técnica para la separación y selección de espermatozoides X y Y (Johnson *et al.*, 2005).

Una de las desventajas de la citometría de flujo es la reducida vida útil de los espermatozoides posterior al proceso de separación, determinando que su viabilidad y capacidad fecundante en el tracto genital femenino se vean afectadas por daños a la membrana y a la reacción acrosomal (Blondin *et al.*, 2009). Por ejemplo, en vaquillas, Seidel *et al.* (1999) reportaron una tasa de gestación de 43% al inseminar con semen sexado y 62% con semen no sexado, y Cisale (2006) encontró 45% vs 60%, respectivamente. Otra desventaja de esta técnica es el alto costo y difícil acceso a la tecnología (de Vries *et al.*, 2008) por el equipo que se requiere para procesar las muestras de semen.

2.2.2 Columnas de albúmina

Entre las técnicas disponibles para separar espermatozoides basadas en un gradiente de concentración y en la ley de Stokes que consiste en la sedimentación de una esfera a través de un fluido viscoso a bajo número de Reynolds (Mc Donald y Burns, 1978; López *et al.*, 1992), se encuentra la técnica columnas de albúmina, la cual se puede implementar en cualquier unidad de producción debido a que hay una desviación de la proporción de sexos, y los costos del equipo y materiales no son elevados. La confiabilidad de la técnica es de 70 a 80%, utiliza gradientes a base de albúmina sérica humana (hSA) en concentraciones de 7.5, 12.5 y 20%; donde en humanos se encontró una desviación de 75% hacia el sexo masculino (Beernink y Ericsson, 1982).

La técnica se basa en que los espermatozoides portadores del cromosoma sexual Y son menos pesados pues contienen menor porcentaje de ADN que los espermatozoides portadores del cromosoma sexual X (Cran *et al.*, 1995). Johnson y Welch (1999) reportaron 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 rápido en las fracciones de albúmina de mayor concentración.

A continuación se presentan resultados de investigaciones al utilizar la técnica columnas de albúmina en algunas especies de interés zootécnico y en humanos.

Claassens *et al.* (1995), al modificar la técnica descrita por Beernink y Ericsson (1982), incrementaron la concentración de hSA de 7.5 a 10% y encontraron diferencias de 54.44% de espermatozoides portadores del cromosoma sexual Y comparado con 50.29% antes de la separación. Silverman *et al.* (2002), al utilizar la técnica columnas de albúmina modificando la concentración de las fracciones a 7.5 y 17.5%, reportaron una desviación hacia el sexo femenino en partos simples de 72.3% y en partos gemelares de 66.7%. Ambas investigaciones fueron realizadas en humanos.

En bovinos, Beal *et al.* (1984) no encontraron diferencias en la desviación de la proporción de sexos con la técnica mencionada al modificar la fuente de albúmina (BSA; albúmina sérica bovina) y la concentración de las fracciones de BSA, 4 y 10%.

Cortés *et al.* (2007), al utilizar la técnica columnas de albúmina en ovinos para la producción de machos, no obtuvieron diferencias (desviación de 59.09%). De forma contraria, Flores *et al.* (2007) reportaron una desviación de 84.21% hacia machos al usar la misma técnica, buscando obtener hembras al inseminar con los espermatozoides de la fracción de hSA al 12.5%. La técnica de sexado no afectó la fertilidad en ambos estudios.

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

Los resultados obtenidos en diversas especies son controversiales, por lo que investigaciones en características espermáticas (movilidad, morfología, ultraestructura y bioquímica) y del fluido viscoso son necesarias para mejorar la eficiencia de la técnica.

2.2.3 Centrifugación en gradientes de densidad

Esta técnica separa a los espermatozoides conforme a sus velocidades de sedimentación por centrifugación en gradientes de diferente densidad, siempre que la densidad del material del gradiente sea menor que la de los espermatozoides; el tiempo requerido para la separación es corto (Beernink, 1984). El procedimiento (Wang, 1994) consiste en preparar dos soluciones de diferente concentración (35 y 84%) con Ham's F10 y 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 *g* durante 8 minutos. Los espermatozoides contenidos en la fracción de mayor concentración (84%) se centrifugan a 800 *g* por 5 minutos y el sedimento celular se lava tres veces con una solución buffer a base de fosfatos. Aleahmad *et al.* (2009) reportan que la fracción del 84% contiene un similar porcentaje de espermatozoides X comparado con el control (51.9 vs 51.2%). Estos resultados no presentan una desviación atractiva en la proporción de espermatozoides X:Y; lo cual es una limitante para realizar la separación espermática y aplicarla a nivel comercial.

2.2.4 Motilidad y separación por electroforesis

En esta técnica, los espermatozoides inmóviles son atraídos hacia el ánodo en un pH neutro. Cuando la separación electroforética se realiza en condiciones acordes con la motilidad espermática, los espermatozoides migran hacia el cátodo. Estas células son orientadas por un campo eléctrico y se desplazan en la dirección de su cabeza. Si se cargan negativamente, los espermatozoides pueden orientarse de modo que la cola apunte al ánodo en virtud de su mayor densidad de carga negativa, y su motilidad intrínseca es mayor que la electroforética (Beernink, 1984).

En especies de interés zootécnico, el método más eficiente para la separación espermática es la citometría de flujo pero sus limitantes son el costo elevado y el bajo nivel de fertilidad; por lo que otras técnicas, menos eficientes en su proceso de separación pero a un menor costo y que no pongan en riesgo la fertilidad, pueden ser atractivas para el productor.

2.3 Determinación del sexo por citometría de flujo

Como se mencionó anteriormente, en una población de células espermáticas se puede determinar el sexo mediante diversas técnicas por citometría de flujo.

Una de éstas técnicas, además de la tinción del ADN con Hoechst 33324, es la determinación de ADN mediante yoduro de propidio (IP); la cual está diseñada para aislar y teñir los núcleos celulares de especímenes sólidos, frescos o congelados, y de células en suspensión para su análisis por citometría de flujo. Con ello, es posible validar la separación espermática de acuerdo con el cromosoma sexual que portan los espermatozoides para conocer la eficiencia del proceso de sexado de cualquier técnica empleada.

La técnica utiliza el Cycle TEST PLUS ADN Reagent Kit que disuelve los lípidos de la membrana celular con un detergente no iónico, elimina el citoesqueleto y las proteínas nucleares con tripsina, digiere el ARN y estabiliza la cromatina con espermina (Vindelov *et al.*, 1983a,b). El yoduro de propidio es estequiométricamente obligado para la limpieza, se aíslan los núcleos y se someten al citómetro de flujo equipado con capacidad electrónica de doble discriminación (Humason, 1979; Martens *et al.*, 1981).

Los núcleos de las células se preparan en suspensiones uniformes para la tinción con IP y su posterior análisis; éstos emiten luz fluorescente principalmente en longitudes de onda entre 580 y 650 nm. El detector FACScan's fluorescencia 2, equipado con un filtro banda de paso 585/42, se utiliza para analizar la fluorescencia emitida entre 564 y 606 nm por las células teñidas. Los reactivos que contiene el Cycle TEST PLUS ADN Reagent Kit, son:

- a) Solución A. Contiene tripsina en un detergente buffer de tetrahidrocloreuro de espermina para la desagregación enzimática de los fragmentos de tejido sólido y la digestión de las membranas celulares y el citoesqueleto.
- b) Solución B. Contiene inhibidores de la tripsina y ribonucleasa A en un buffer de citrato con tetrahidrocloreuro de espermina para inhibir la actividad de la tripsina y digerir el ARN.

- c) Solución C. Contiene IP y tetrahidrocloruro de espermina en un buffer de citrato. El IP estequiométricamente se une al ADN en una concentración final de al menos $125 \mu\text{g mL}^{-1}$.
- d) Solución buffer. Contiene citrato de sodio, sacarosa y dimetilsulfóxido para la colección y/o congelación de las suspensiones celulares.

2.4 Medición de la movilidad espermática

Actualmente, los métodos para medir la movilidad espermática son semicuantitativos y cuantitativos. El primero, evalúa el porcentaje de espermatozoides móviles y el tipo de movimiento que presenta la mayoría de la población espermática; la metodología es sencilla, económica y brinda la información en forma rápida, pero sus limitantes son la exactitud y la precisión debidas al sistema de medida y a la destreza del observador (Vázquez *et al.*, 1997). El segundo método, generalmente conocido como CASA (Computer Assisted Semen Analysis), brinda de manera efectiva medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides (Mortimer, 2000),

El análisis computarizado de la motilidad espermática derivó de la digitalización de imágenes y fue propuesto por primera vez en 1979 (Dott y Foster, 1979); con este método se puede evaluar la concentración, el movimiento y la morfología del espermatozoide. Los valores obtenidos del análisis se ven limitados por factores técnicos (temperatura del semen, volumen analizado, tipo de cámara utilizada, concentración de la muestra, valores del “set up” asociado al CASA) y biológicos (diversas patologías) (Verstegen *et al.*, 2002); por lo que la interpretación de los datos depende del conocimiento de las condiciones en que se realice el análisis (Mortimer, 2002).

El análisis de la movilidad mediante CASA se hace al captar imágenes de los espermatozoides en movimiento, la información se transfiere a un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en parámetros que caracterizan la motilidad individual (Cancel *et al.*, 2000); dependiendo del

sistema CASA a utilizar se pueden obtener diversos parámetros (Holt *et al.*, 1997) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Parámetros de motilidad evaluados mediante CASA.

Parámetro	Definición
Velocidad curvilínea (VCL)	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo ($\mu\text{m segundo}^{-1}$).
Velocidad rectilínea (VSL)	Distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y último punto de su trayectoria ($\mu\text{m segundo}^{-1}$).
Velocidad promedio (VAP)	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media ($\mu\text{m segundo}^{-1}$).
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH)	Desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal (μm).
Frecuencia de batida de la cabeza (BCF)	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo (Hz).
Índice de linearidad (LIN)	Relación porcentual entre VSL y VCL (%).
Índice de rectitud (STR)	Relación porcentual entre VSL y VAP (%).

En el campo de reproducción animal, diversas investigaciones (Tartaglione y Ritta, 2004) han demostrado que existe una correlación entre la motilidad y la fertilidad, *in vivo* e *in vitro*, al utilizar semen no sexado; por lo que la integración de los parámetros que proporciona CASA puede ayudar a incrementar la fertilidad en los sementales (Christensen *et al.*, 2005).

Aunque una de las limitantes del uso de semen sexado es la baja fertilidad, CASA sirve como una herramienta para evaluar los parámetros de motilidad del

semen sexado, y decidir si el lote de semen es apto para programas de fertilización *in vitro* e inseminación artificial.

2.5 Factores que afectan a los espermatozoides durante el proceso de sexado

Actualmente la citometría de flujo es la técnica utilizada comercialmente para separar a los espermatozoides X y Y; sin embargo, los niveles de fertilidad del semen sexado son bajos comparados con los del no sexado (Bodmer *et al.*, 2005). Esto se puede atribuir a las condiciones de estrés a que se someten los espermatozoides durante el proceso de sexado.

Para sexar una muestra de semen se debe someter a altas tasas de dilución, por lo que la concentración de proteínas y lípidos del plasma seminal se reduce; esto trae como consecuencia un impacto negativo en la viabilidad y motilidad de los espermatozoides (Ashwort *et al.*, 1994; Maxwell *et al.*, 1998).

Algunos autores reportan que la tinción con el fluorocromo Hoechst 33342, las temperaturas de incubación, la exposición a los rayos ultravioleta, los cambios de presión y el estrés físico en el citómetro, son factores que disminuyen la viabilidad y el estatus de la membrana de los espermatozoides (Seidel y Garner, 2002). Actualmente se está trabajando en reducir las condiciones estresantes durante el proceso de sexado, pues se logran efectos benéficos en la motilidad, desarrollo embrionario y fertilidad (Campos-Chillon y de la Torre, 2003; Suh *et al.*, 2005).

En estudios realizados con espermatozoides de cerdo, no se han encontrado efectos mutagénicos al exponer las células espermáticas a los rayos ultravioleta y al fluorocromo Hoechst 33342 durante la citometría de flujo (Parrilla *et al.*, 2004). Aún cuando el procedimiento del sexado es estresante para los espermatozoides, diversos autores reportan que el proceso clasifica y separa únicamente a las células espermáticas de mejor calidad en términos de motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y ADN, y actividad mitocondrial (de Graaf *et al.*, 2006; de Graaf *et al.*, 2007a).

2.6 Factores que afectan fertilidad y prolificidad en hembras inseminadas con semen sexado

2.6.1 Fertilidad

En general, las hembras que se inseminan con semen sexado presentan menores tasas de gestación comparadas con las hembras inseminadas con semen no sexado (Garner, 2006). Esto es atribuible a un conjunto de factores que a continuación se mencionarán, y no solo depende del proceso de sexado.

Semental. En la investigación de Seidel y Schenk (2008), se inseminaron vaquillas con semen sexado congelado de dos machos Angus y obtuvieron tasas de gestación de 62 vs 75% ($p<0.05$). En estudios *in vitro* (Blondin *et al.*, 2009), la producción de blastocistos fue diferente entre tres toros, 12.7, 17.5 y 8.0 %; esto puede atribuirse a factores propios de los sementales como calidad seminal, composición seminal y algunas patologías.

Procesamiento del semen. En vaquillas, Seidel *et al.* (1999) reportaron tasas de gestación de 30, 51 y 73% ($p<0.04$) al inseminar con semen sexado congelado, sexado fresco y congelado. En ovejas se obtuvieron tasas de gestación similares (48.6, 46.1 y 36.1%) al inseminar con semen no sexado-congelado, sexado-congelado y congelado-sexado-recongelado (de Graaf *et al.*, 2007b). Los resultados indican que la viabilidad de los espermatozoides depende de la cantidad de procedimientos a los cuales son sometidos.

Dosis. En vaquillas, Cran (2003) reportó tasas de gestación de 44.6 y 62.3% al inseminar con semen sexado congelado y sexado fresco, con dosis de 2 a 3 millones de espermatozoides. Los resultados anteriores varían con los reportados por Bodmer *et al.* (2005), quienes al inseminar vaquillas con dosis de 2 millones de espermatozoides sexados congelados obtuvieron 33.30% de gestaciones.

En ovejas, Evans *et al.* (2004) al inseminar con diferentes concentraciones de espermatozoides sexados mediante citometría de flujo y no sexados usando 5,

10, 20 y 40 millones, obtuvieron tasas de gestación de 20 vs 46.7%, 42.9 vs 71.4%, 31.3 vs 38.5% y 72.7 vs 66.7%, comparativamente con el grupo control comercial no sexado (100 millones y 53.8%). Maxwell *et al.* (2003) al utilizar dosis de 5, 10, 20 y 40 millones de espermatozoides sexados congelados obtuvieron tasas de gestación de 33.3, 57.1, 34.5 y 69.6%, las cuales son comparables al 53.8% obtenido al utilizar 50 millones de espermatozoides no sexados congelados. Un estudio reciente demostró que con una dosis de un millón de espermatozoides sexados, se logró una tasa de gestación mayor comparativamente con la misma dosis de semen no sexado (36 vs 16%); esto se debe a que durante el proceso de sexado solo se selecciona a una población espermática “super fértil” (Beilby *et al.*, 2009).

Las tasas de gestación reportadas en cerdas por Vázquez *et al.* (2003) fueron diferentes (39.1 y 78.7%; $p < 0.05$) al inseminar con 70 millones de espermatozoides sexados mediante citometría de flujo y no sexados; y 46.6 y 85.7% al inseminar con 140 millones de espermatozoides sexados y no sexados.

En general, los resultados presentados en las especies mencionadas indican que no es recomendable reducir la dosis de semen para no comprometer la fertilidad.

Sitio de depósito del semen. Seidel y Schenk (2008) no encontraron diferencias ($p > 0.1$) en la tasa de gestación al inseminar vaquillas con semen sexado en el cuerpo del útero (53%) y en el cuerno uterino (54%). De forma contraria, de Graaf *et al.* (2009) reportan tasas de gestación de 9.8% al inseminar ovejas vía pericervical con semen sexado congelado, comparativamente con un 57% de gestación reportada por Maxwell *et al.* (2003) al inseminar vía intrauterina.

Edad. En general las vaquillas presentan mayor fertilidad en comparación con las vacas. En la investigación realizada por Bodmer *et al.* (2005) se inseminaron vaquillas y vacas con dos tipos de semen: sexado congelado y congelado; obtuvieron tasas de gestación de 33.3 vs 59.3% en vaquillas, y 27.6 vs 28.1%

en vacas. La diferencia posiblemente se debe a que las vaquillas no presentan tantos problemas reproductivos como las vacas.

2.6.2 Prolificidad

En cuanto a prolificidad de hembras inseminadas con semen sexado no se reportan resultados en la mayoría de los trabajos, ya que enfocan sus investigaciones únicamente a la desviación en la proporción de sexos. En cerdas no se reportan diferencias ($p>0.05$) en prolificidad (Vázquez *et al.*, 2003) al inseminar con semen sexado y no sexado. Al utilizar la técnica columnas de albúmina en humanos, de 226 nacimientos 81.4% fueron partos simples y 18.6% partos gemelares (Silverman *et al.*, 2002). En ovinos (Cortés y Flores, 2008) no se reportan diferencias en prolificidad al inseminar con semen sexado y no sexado (1.58 vs 1.70), utilizando la misma técnica de inseminación.

2.7 Literatura citada

- Aleahmad, F., H. Gourabi, B. Zeinali, S. Kazemi, and H. Baharvand. 2009. Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa by sperm isolation medium gradients evaluated by FISH. *Reproductive BioMedicine Online* 18: 475-478.
- Ashworth, P. J. C., R. A. P. Harrison, N. G. A. Miller, J. M. Plummer, and P. H. Watson. 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development* 94:173-180.
- Barlow, P., and C. G. Vosa. 1970. The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 226: 961-962.
- Beal, W. E., L. M. White, and D. L. Garner. 1984. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient. *Journal of Animal Science* 58: 1432-1436.
- Beernink, F. J., and R. J. Ericsson. 1982. Male sex preselection through sperm isolation. *Fertility and Sterility* 38: 493-495.
- Beernink, F.J. 1984. Factors influencing the human sex ratio. *In: Annual Meeting of the American Fertility Society*. April. New Orleans, Louisiana, United States. pp: 76-85.
- Beilby, K. H., C. G. Grupen, P. C. Thomson, W. M. C. Maxwell, and G. Evans. 2009. The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. *Theriogenology* 71: 829-835.

- Blecher, S. R., R. Howie, S. Li, J. Detmar, and L. M. Blahut. 1999. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology* 52: 1309-1321.
- Blondin, P., M. Beaulieu, V. Fournier, N. Morin, L. Crawford, P. Madan, and W. A. King. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71: 30-38.
- Bodmer, M., F. Janett, M. Hässig, N. den Daas, P. Reichert, and R. Thun. 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64: 1647-1655.
- Campos-Chillon, L. F., and J. F. de la Torre. 2003. Effect of concentration of sexed bovine sperm sorted at 40 and 50 PSI on developmental capacity of *in vitro* produced embryos. *Theriogenology* 59: 506 (Abstr.).
- Cancel, M. A., D. Lobde, P. Mendola, and S. D. Perreault. 2000. Objective evaluation of hiperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Human Reproduction* 15:1322-1328.
- Christensen, P., C. Hansen, T. Liboriussen, and H. Lehn-Jensen. 2005. Implementation of flow cytometry for quality control in four Danish bull studs. *Animal Reproduction Science* 85: 201-208.
- Cisale, H. O. 2006. Sexaje de semen: ventajas y desventajas de su uso en bovinos lecheros. *Revista de Medicina Veterinaria* 87: 106-108.
- Claasens, O. E., C. J. Oosthuizen, J. Brusnicky, D. R. Franken, and T. Kruger. F. 1995. Fluorescent *in situ* hybridization evaluation of human T-bearing spermatozoa separated by albumin density gradients. *Fertility and Sterility* 63: 417-418.
- Cortés V., P., R. Rangel S., C. A. Apodaca S., y J. Ayala O. 2007. Sexado de semen ovino utilizando la técnica columnas de albúmina para obtener machos. *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. pp: 392-394.
- Cortés V., P., y P. S. Flores M. 2008. Sexado de semen ovino utilizando la técnica columnas de albúmina. Tesis de Licenciatura. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México. 31 p.
- Cran, D. G., L. A. Johnson, N. G. Miller, D. Cochrane, and C. E. Polge. 1993. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. *Veterinary Record* 132: 40-41.
- Cran, D. G., L. A. Johnson, and C. E. Polge. 1995. Sex preselection in cattle: a field trial. *Veterinary Record* 136: 495-496.

- Cran, D. G. 2003. Current developments in sperm sorting in farm animals. *In*: 19th Meeting of European Embryo Transfer Association. 12 to 13 september. Rostock, Germany. pp: 113-123.
- de Graaf, S. P., G. Evans, W. M. C. Maxwell, and J. K. O'Brien. 2006. *In vitro* function of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa after sex sorting and re-freezing. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 867-874.
- de Graaf, S. P., G. Evans, L. Gillan, M. P. P. Guerra, W. M. C. Maxwell, and J. K. O'Brien. 2007a. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the *in vitro* quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* 67: 217-227.
- de Graaf, S. P., G. Evans, W. M. C. Maxwell, D. G. Cran, and J. K. O'Brien. 2007b. Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 67: 391-398.
- de Graaf, S. P., K. H. Beilby, S. L. Underwood, G. Evans, and W. M. C. Maxwell. 2009. Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. *Theriogenology* 71: 89-97.
- de Vries, A., M. Overton, J. Fetrow, K. Leslie, S. Eicker, and G. Rogers. 2008. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Journal of Dairy Science* 91: 847-856.
- Dott, H. M., and G. C. Foster. 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal of Reproduction and Fertility* 55: 161-166.
- Evans, G., F. K. Hollinshead, and W. M. C. Maxwell. 2004. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reproduction Fertility and Development* 16: 455-464.
- 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. pp: 395-397.
- Garner, D. L. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65: 943-957.
- Hafez, E. S. E., and B. Hafez. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7 ed. Mc Graw Hill (ed.). México. 519 p.
- Hernández, P. J. E., R. F. Fernández, C. J. Reyes, P.G. Cerezo, J. L. Echegaray, y B. Mendoza. 2008. Separación de espermatozoides "Y" de eyaculado de conejo por medio de gradientes de densidad de albúmina sérica humana. *Revista de Salud Animal* 30: 45-49.

- Holt, C., W. V. Holt, H. D. Moore, H. C. Reed, and R. M. Curnock. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology* 18: 312-323.
- Howes, E. A., N. G. A. Miller, C. Dolby, A. Hutchings, G. W. Butcher, and R. Jones. 1997. A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. *Journal of Reproduction and Fertility* 110: 195-204.
- Humason, G. L. 1979. Staining hematologic elements and related tissues. *In: Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W.H. Freeman & Company. pp: 229-230.
- Jafar, S. I., and A. P. F. Flint. 1996. Sex selection in mammals: A review. *Theriogenology* 46: 191-200.
- Johnson, L. A. 1988. Flow cytometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X- or Y- bearing sperm. *Theriogenology* 29: 265.
- Johnson, L. A. 1995. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 893-903.
- Johnson, L. A., and G. R. Welch. 1999. Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52: 1323-1341.
- Johnson, L. A. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of the-art. *Animal Reproduction Science* 60-61: 93-107.
- Johnson, L. A., D. Rath, J. M. Vázquez, W. M. C. Maxwell, and J. R. Dobrinsky. 2005. Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology* 63: 615-625.
- López, V., E. Maneiro, M. Navarro, y E. Costas. 1992. Nuevas aproximaciones al estudio de los espermatozoides: aspectos hidrodinámicos de la movilidad espermática. *Archivos de Zootecnia* 41: 219-230.
- Martens, A. C., G. J. van den Engh, and A. Hagenbeek. 1981. The fluorescence intensity of propidium iodide bound to DNA depends on the concentration of sodium chloride. *Cytometry* 2: 24-25.
- Mc Donald, S., y D. Burns. 1978. Propiedades de los líquidos. *In: Física para las Ciencias de la Vida y de la Salud*. Fondo Educativo Interamericano (ed.). pp: 159-186.
- Maxwell, W. M. C., C. R. Long, L. A. Johnson, J. R. Dobrinsky, and G. R. Welch. 1998. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development* 10: 433-440.

- Maxwell, W. M. C., F. K. Hollinshead, D. Rath, J. K. O'Brien, and G. Evans. 2003. Effect of dose of sperm processed for sex-sorting and cryopreservation on fertility in ewes. *Theriogenology* 52: 511(abstract).
- Maxwell, W. M. C., G. Evans, F. K. Hollinshead, R. Bathgate, S. P. Graaf, B. M. Eriksson, L. Gillan, K. M. Morton, and J. K. O'Brien. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* 82-83: 79-95.
- Mohri, H., S. Oshio, S. Kaneko, T. Kobayashi, and R. Lizuka. 1987. Separation and characterization of mammalian X- and Y- bearing sperm. *In: New Horizons in Cell Research*. Japan Scientific Society Press Tokyo and Gordon and Breach Scientific Publishers (ed.). New York. pp: 469-481.
- Mortimer, S. 2000. CASA- Practical aspects. *Journal of Andrology* 21: 515-524.
- Mortimer, S. T. 2002. Practical application of computer-aided sperm analysis (CASA). *In: IX International Symposium on Spermatology*. October 6 to 11. Cape Town, South Africa. p. 79.
- Moruzzi, J. F. 1979. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y chromosome-bearing spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 57: 319-323.
- Ollero, M., R. Perez-Pé, I. Gargallo, S. Morlanes, J. Osada, T. Muiño-Blanco, and J. Cebrian-Perez. 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.
- Parrilla, I., J. M. Vázquez, C. Cuello, M. A. Gil, J. Roca, D. Di Berardino, and E. A. Martínez. 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction* 128: 615-621.
- Seidel, G. E., J. L. Schenk, L. A. Herickhoff, S. P. Doyle, Z. Brink, R. D. Green, and D. G. Cran. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52: 1407-1420.
- Seidel, G. E., and D. L. Garner. 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124: 733-743.
- Seidel, G. E., 2003. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59: 585-598.
- Seidel, G. E., and J. L. Schenk. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science* 105: 129–138.
- Silverman, A. Y., S. R. Stephens, M. T. Drouin, R. G. Zack, J. Osborne, and S. A. Ericsson. 2002. Female sex selection using clomiphene citrate and albumin separation of human sperm. *Human Reproduction* 17: 1254-1256.

- Suh, T. K., J. L. Schenk, and G. E. Seidel. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64: 1035-1048.
- Tartaglione, C. M., and M. N. Ritta. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62: 1245-1252.
- van Munster, E. B. 2002. Interferometry in flow to sort unstained X- and Y chromosome bearing bull spermatozoa. *Cytometry* 47: 192-199.
- Vázquez, J. M., E. A. Martínez, P. Martínez, J. Roca, O. Blanco, X. Lucas, y C. Matas. 1997. Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides de verraco. *In: IV Simposium Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial Porcina*. 3 al 5 de mayo. Madrid, España. p. 83-90.
- Vázquez, J. M., E. M. Martínez, J. Roca, X. Lucas, X., and I. Parrilla. 2001. Sex-sorting boar sperm: problems and possibilities. *Archives Animal Breeding* 44: 141-144.
- Vázquez, J. M., E. A. Martínez, I. Parrilla, J. Roca, M. A. Gil, and J. L. Vázquez. 2003. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1605-1614.
- Verstegen, J., M. Iguer-Ouada, and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Vindelov, L. L., I. J. Christensen, G. Jensen, and N. I. Nissen. 1983 a. Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining, and internal standardization. *Cytometry* 3: 332-339.
- Vindelov, L. L., I. J. Christensen, and N. I. Nissen. 1983 b. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-327.
- Wang, H. X., S. P. Flaherty, N. J. Swann, and C. D. Matthews. 1994. Discontinuous Percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction* 9: 1265-1270.
- Barlow, P., and C. G. Vosa. 1970. The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 226: 961-962.

3. TÉCNICA COLUMNAS DE ALBÚMINA PARA SEXAR SEMEN DE CARNERO

3.1 Resumen

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficiencia al utilizar semen sexado de carnero mediante la técnica columnas de albúmina en fertilidad, proporción de sexos, peso al nacimiento, prolificidad, características seminales (motilidad, viabilidad y concentración) y patrón de movimiento espermático (velocidades promedio (VP), curvilínea (VC) y rectilínea (VR)). La investigación constó de dos fases: 1) Campo, ovejas Criollas (n=66) se asignaron al azar a los tratamientos: T1) inseminación artificial (IA) con espermatozoides (SPZs) no sometidos a la técnica de columnas de albúmina (no sexados) (n=20); T2) IA con SPZs en solución de hSA al 20% (n=21); y T3) IA con SPZs en solución de hSA al 17.5% (n=25); y 2) Laboratorio, los SPZs evaluados corresponden a los tratamientos: T1) SPZs en la fracción de hSA al 20% y T2) SPZs en la fracción de hSA al 17.5%; usando un diseño completamente al azar. La fertilidad y proporción de sexos se evaluaron mediante pruebas de Chi-cuadrada y las variables restantes mediante ANOVA. Las ovejas del T3 mostraron una desviación ($p < 0.14$) en la proporción de sexos hacia hembras al compararlas con las ovejas del T1 y T2 (65.38 vs 36.84 y 30.43%, respectivamente); las demás variables fueron similares ($p > 0.05$) en los tres tratamientos. Las características seminales y el patrón de movimiento fueron similares ($p > 0.05$) en T1 y T2. En conclusión, la concentración de hSA modificó la proporción de sexos de los corderos pero no la fertilidad, la prolificidad, las características seminales ni el patrón de movimiento espermático.

Palabras clave: *Ovis aries*, proporción de sexos, albúmina sérica humana, movimiento espermático.

ALBUMIN COLUMNS TECHNIQUE FOR SEXING RAM SEMEN

3.2 Abstract

The objective of this investigation was to evaluate the efficiency of using ram sexed semen through the albumin columns technique on fertility, sex ratio, birth weight, prolificacy, semen characteristics (motility, viability and concentration) and pattern of sperm motility (average (VP), curvilinear (VC) and rectilinear (VR) velocities). The investigation consisted of two phases: 1) Field, Creole ewes (n=66) were assigned randomly to one of the following treatments: T1) artificial insemination (AI) with spermatozoa (SPZs) not subjected to the albumin columns technique (unsexed) (n=20), T2) AI with SPZs in a 20% hSA solution (n=21), and T3) AI with SPZs in a 17.5% hSA solution (n=25), and 2) Laboratory, the SPZs evaluated correspond to the treatments: T1) the SPZs evaluated correspond to the fraction of 20% hSA and T2) the SPZs evaluated correspond to the fraction of 17.5% hSA, using a completely randomized design. Fertility and sex ratio were evaluated by Chi-square tests and the remaining variables by ANOVA. Ewes of T3 showed a deviation ($p<0.14$) in the sex ratio towards females compared to ewes from T1 and T2 (65.38 vs 36.84 and 30.43%, respectively). All the other variables were similar ($p>0.05$) among the treatments. The seminal characteristics and pattern of sperm motility were similar ($p>0.05$) in T1 and T2. In conclusion, the concentration of hSA changed the sex ratio of lambs but not fertility, prolificacy, the seminal characteristics and pattern of sperm motility.

Key words: *Ovis aries*, sex ratio, human serum albumin, sperm motility.

3.3 Introducción

En la reproducción natural la proporción de sexos es aproximadamente 50:50 (Xu *et al.*, 2009), lo cual puede modificarse utilizando distintas metodologías para la separación espermática.

Una de estas metodologías es la técnica columnas de albúmina con una confiabilidad de 70 a 80% hacia el sexo deseado (Beernink y Ericsson, 1982). Para realizar la separación espermática se utilizan columnas de vidrio con fracciones de diferente concentración de albúmina sérica humana (hSA). De acuerdo con el fundamento de la técnica, sedimentación hasta el nivel en que el peso de los espermatozoides y el medio (hSA) se igualan en un determinado tiempo (Mac Donald y Burns, 1978; López *et al.*, 1992; Hafez y Hafez, 2000), los espermatozoides siguen una trayectoria en sentido de la gravedad ayudados por su facilidad de movimiento, no por su peso.

Al colocar una muestra de semen sobre una columna de hSA con dos soluciones de concentración distinta, se espera que los espermatozoides portadores del cromosoma sexual X sedimenten más rápido en la capa de mayor concentración debido a que son más pesados, con mayor volumen de cabeza y contenido de ADN (van Munster *et al.*, 1999) en comparación con los espermatozoides portadores del cromosoma sexual Y; todo ello a un tiempo determinado, ya que al igualarse los pesos de las subpoblaciones de espermatozoides (X y Y) con la hSA, los espermatozoides portadores del cromosoma sexual Y, que tienen mayor movilidad (Ericsson *et al.*, 1973; Ollero *et al.*, 2000), migrarán en sentido de la gravedad logrando penetrar en la fracción de mayor concentración, permitiendo separar de manera eficiente las subpoblaciones.

La técnica columnas de albúmina ha mostrado ser simple y económica (Beal *et al.*, 1984; Beernink y Ericsson, 1982; Claassens *et al.*, 1995; Cortés *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008) y Silverman *et al.* (2002) han modificado la concentración de hSA con la finalidad de cambiar la proporción de

sexos al nacimiento pero los resultados han sido contradictorios. Por otra parte, no se ha caracterizado el patrón de movimiento espermático en las fracciones de distinta concentración de hSA que permita suponer subpoblaciones X o Y.

El objetivo de la investigación fue comparar la eficiencia en fertilidad y en proporción de sexos, y caracterizar el patrón de movimiento espermático utilizando dos concentraciones de albúmina sérica humana en semen de carnero para la selección del sexo de la descendencia.

3.4 Materiales y métodos

La presente investigación incluye un experimento de campo y dos ensayos de laboratorio.

3.4.1 Experimento de campo

Localización

La investigación se realizó en el Módulo de Ovinos y Laboratorio de Reproducción de la Granja Experimental del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo localizada a 19° 29" Latitud Norte y 98° 55" Longitud Oeste y 2250 msnm. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (C(w)(W)b(i)g), con una temperatura media anual de 15 °C y la precipitación es de 644.8 mm (García, 1991).

Animales, tratamientos y diseño experimental

Las ovejas Criollas (n=66) se asignaron a los siguientes tratamientos: T1) IA con espermatozoides no sometidos a la técnica columnas de albúmina (no sexados) (n=20); T2) IA con espermatozoides en solución de hSA al 20% (n=21); y T3) IA con espermatozoides en solución de hSA al 17.5% (n=25). La concentración de hSA del T3 es la modificación que se hizo a la técnica columnas de albúmina, es por ello que en los tratamientos T2 y T3, no se lleva un orden ascendente en la concentración de hSA. El diseño experimental

utilizado fue completamente al azar con número de repeticiones desbalanceado, en donde la unidad experimental fue la oveja.

Manejo alimenticio

Los animales utilizados se mantuvieron confinados durante la investigación y fueron alimentados con base en sus necesidades fisiológicas; se utilizó un concentrado con 12% PC y 2.1 Mcal de EM, y heno de avena como fuente de forraje. Adicionalmente se proporcionó agua a libre acceso.

Sincronización de estros, inseminación artificial y manejo reproductivo

Las ovejas Criollas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales conteniendo 40 mg de Acetato de Fluorogestona (FGA; Chronogest, Intervet) que permanecieron insertadas por 12 días. El día 10 se aplicaron 500 UI de Gonadotropina Sérica de Yegua Gestante (PMSG; Folligon, Intervet), el día 12 se removieron las esponjas y la incidencia de celos se determinó del día 13 al 15. Los celos fueron detectados cada seis h iniciando a las 24 h post remoción de la esponja hasta las 72 h, con un macho marcador provisto de un mandil para evitar la cópula. La inseminación artificial (IA) se realizó por vía intrauterina con un laparoscopio (Killen y Caffery, 1982) 24 h después de detectado el celo. La dosis de espermatozoides a inseminar fue de 100×10^6 en pajillas de 0.25 mL.

El diagnóstico de gestación se realizó a los 45 días después del servicio en ovejas que no retornaron al celo, se utilizó un ultrasonido de tiempo real (Sonovet 600, Madison, WI, USA) equipado con un transductor sectorial de 3.5 MHz.

Procedimientos de laboratorio para la obtención de los espermatozoides

El semen utilizado en la IA se sometió a la técnica columnas de albúmina con una modificación en la concentración en una de las soluciones de albúmina sérica humana (hSA), para separar a las células portadoras del cromosoma sexual X se utilizaron soluciones con concentraciones de 17.5 y 20 % de hSA.

La técnica se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Beernink y Ericsson (1982).

A la muestra de semen se le realizó un análisis microscópico y fue diluida en medio HAM'S F-10 modificado con albúmina (Irvine Scientific) para tener una concentración espermática de $300 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$.

Para formar las columnas de albúmina, con hSA y HAM'S F-10 modificado con albúmina, se prepararon 10 mL de cada una de las siguientes soluciones: 20, 17.5 y 12.5%; se colocaron alícuotas de 0.5 mL de la solución de hSA al 20% en 20 columnas de vidrio de 8 x 75 mm (Pyrex), después se colocaron alícuotas de 0.5 mL de la solución de hSA al 17.5% en otras 20 columnas de vidrio de 8 x 75 mm; finalmente, se colocaron alícuotas de 1 mL en las columnas de vidrio donde se encontraban las soluciones al 17.5 y 20%.

De la muestra de semen diluido se tomaron alícuotas de 0.5 mL y fueron colocadas en las 40 columnas de albúmina sobre la solución de hSA al 12.5%. Cada columna se tapó con papel aluminio y se dejaron incubar a 37 °C por una hora. El semen diluido fue retirado y las columnas se dejaron incubar a 37 °C por 30 minutos más. Posteriormente, la solución de hSA al 12.5% se removió. Las soluciones de hSA al 17.5 y 20% fueron centrifugadas por separado a 500 g por 10 minutos. El sedimento celular (espermatozoides) de cada solución se diluyó por separado con medio HTF modificado con hepes (Irvine Scientific) y se prepararon las dosis de espermatozoides para inseminar.

Variables respuesta

Las variables analizadas fueron: fertilidad en ovejas Criollas, proporción de sexos al nacimiento y peso de los corderos, y prolificidad. Para analizar la fertilidad se calculó el porcentaje de gestación en las ovejas por tratamiento. La proporción de sexos y el peso de los corderos fueron registrados al nacimiento. La prolificidad fue calculada para cada tratamiento al dividir el número de corderos nacidos entre ovejas paridas.

Análisis estadístico

Las variables fertilidad y proporción de sexos se analizaron mediante CATMOD; y el peso de los corderos y prolificidad mediante GLM; ambos procedimientos de SAS 9.1 (SAS, 2004). La comparación de medias para las últimas variables se realizó mediante la prueba de Tukey.

3.4.2 Ensayos de laboratorio

Localización

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio del Área de Reproducción Animal Asistida del Departamento de Biología de la Reproducción, en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Tratamientos y diseño experimental

Las muestras analizadas corresponden a los siguientes tratamientos: T1) espermatozoides en la fracción de hSA al 20% y T2) espermatozoides en la fracción de hSA al 17.5%. Así mismo, se analizaron muestras de las fracciones correspondientes a los dos ensayos: E1) muestra control (A) y columna de hSA con las fracciones residual (B), 12.5 (C) y 20% (D); y E2) muestra control (A) y columna de hSA con las fracciones residual (B), 12.5 (C) y 17.5% (D).

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres repeticiones para las variables motilidad, viabilidad y concentración, y seis repeticiones para las variables velocidades (VP, VC y VR); en donde la unidad experimental fue la alícuota tomada de cada fracción de hSA.

Procedimientos de laboratorio

Con la técnica columnas de albúmina, espermatozoides de carnero fueron sexados y se realizaron dos ensayos: 1) columna de hSA con las fracciones residual 12.5 y 20% y 2) columna de hSA con las fracciones residual, 12.5 y 17.5%; en donde la muestra control fue la misma para los dos ensayos y sólo varió la fracción inferior de las columnas de hSA (tratamientos).

Al finalizar el proceso de sexado, la muestra control y las fracciones de hSA de los E1 y E2 se lavaron por separado en tubos Ependorff con medio HAM'S F-10 y se centrifugaron a 2 500 *g* por 5 minutos; los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 mL de medio HAM'S F-10. Posteriormente se tomaron alícuotas de 10 μ L para determinar cada una de las variables.

Las características seminales (motilidad, viabilidad y concentración) fueron determinadas siguiendo los procedimientos de Rodríguez *et al.* (2008). Después, se caracterizó el patrón de movimiento espermático (velocidades: promedio (VP), curvilínea (VC) y rectilínea (VR)) mediante un sistema computarizado CASA (Hamilton Thorne Research IVOS-10), utilizando la siguiente calibración: campos adquiridos por segundo 60, número de campos 15, contraste mínimo 50, tamaño mínimo de célula 7 pixeles, corte de tamaño de célula 5 pixeles, corte de intensidad de células 70, velocidad promedio 50 μ m segundo⁻¹, umbral de rectitud 70%, corte de VAP 30 μ m segundo⁻¹, corte de velocidad rectilínea 15 μ m segundo⁻¹, tamaño de cabeza estática 0.10 a 3.40 pixeles, intensidad de cabeza estática 0.55 a 1.70 pixeles, elongación estática 0 a 70%.

Variables respuesta

Las variables analizadas fueron las características seminales: motilidad, viabilidad, concentración, y el patrón de movimiento espermático: velocidades promedio, curvilínea y rectilínea.

Análisis estadístico

Las variables motilidad, viabilidad, concentración y velocidades (VP, VC y VR) fueron analizadas mediante el procedimiento GLM de SAS ver. 9.1 (SAS, 2004). La comparación de medias se realizó mediante LSMEANS. Para las variables motilidad y viabilidad se utilizó la transformación arc coseno; sin embargo, los resultados fueron los mismos en los dos análisis, por lo que los datos que se reportan en esta investigación corresponden a los datos originales (sin transformar).

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Resultados de campo

Fertilidad

La fertilidad no varió ($p>0.05$) en ovejas Criollas inseminadas con los tres tipos de espermatozoides (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de gestación^z en ovejas Criollas inseminadas con diferentes tipos de espermatozoides (tratamientos).

Tratamiento	Ovejas Inseminadas	Ovejas Gestantes	Gestación, % ($\bar{x} \pm EE$)
No sexados	20	14	70 $\pm$ 3.87 ^a
20% hSA	21	13	62 $\pm$ 13.46 ^a
17.5% hSA	25	17	68 $\pm$ 11.31 ^a

^z Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($p<0.05$).

Los resultados de fertilidad coinciden con los obtenidos por Flores *et al.* (2007) al inseminar ovejas Suffolk con espermatozoides en la solución de hSA al 12.5% y espermatozoides no sexados; los autores reportaron 78 vs 69% no encontrando diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados indican que la técnica columnas de albúmina no afecta la viabilidad de los espermatozoides.

Al inseminar ovejas con dosis de 40 millones de espermatozoides: sexados mediante citometría de flujo y no sexados, Evans *et al.* (2004) reportaron 72 vs 66% sin diferencias significativas entre tratamientos; por lo que la fertilidad en ovejas no se ve afectada con espermatozoides sometidos a esta técnica. En una investigación realizada por Beilby *et al.* (2009), ovejas fueron inseminadas con dosis de uno y 15 millones de espermatozoides sexados y reportaron tasas de gestación de 29 vs 56%; estos resultados en comparación con los mencionados por Evans *et al.* (2004) indican que la fertilidad fue menor debido a la dosis de espermatozoides a inseminar.

En vaquillas, Seidel *et al.* (1999) reportaron diferencias ($p<0.04$) en la tasa de gestación al inseminar con semen no sexado y sexado (62 vs 43%) mediante citometría de flujo. En comparación con las ovejas, en las vaquillas la fertilidad es menor al inseminar con semen sexado.

Aunque la técnica de citometría de flujo no afecta la fertilidad en ovejas, ya que selecciona a una población de espermatozoides homogénea sin daño alguno (Beilby *et al.*, 2009), su costo es relativamente alto (Garner y Seidel, 2008); por lo que la técnica columnas de albúmina es una alternativa al tener un menor costo y no afectar la fertilidad.

Proporción de sexos

La proporción de sexos al nacimiento en corderos Criollos varió ($p<0.14$) al inseminar ovejas con espermatozoides contenidos en la fracción de hSA al 17.5% (Cuadro 4).

La desviación de sexos lograda mediante la técnica columnas de albúmina coincide con los resultados reportados por diversos autores para ambos sexos.

Cuadro 4. Proporción de sexos^z al nacimiento de crías Criollas al inseminar con diferentes tipos de espermatozoides (tratamientos).

Tratamiento	Hembras	Machos	Hembras, % ($\bar{x}\pm EE$)	Machos, % ($\bar{x}\pm EE$)
No sexados	7	12	36.84 $\pm$ 18.23 ^a	63.16 $\pm$ 13.92 ^a
20% hSA	7	16	30.43 $\pm$ 17.39 ^a	69.57 $\pm$ 11.50 ^a
17.5% hSA	17	9	65.38 $\pm$ 11.54 ^b	34.62 $\pm$ 15.86 ^b

^z Medias sin una letra en común, dentro de columnas, son diferentes ($p<0.05$).

La proporción de hembras al inseminar con espermatozoides de la fracción de hSA al 17.5% coincide con la reportada por Silverman *et al.* (2002), quienes obtuvieron 72% de niñas al inseminar mujeres con los espermatozoides contenidos en la fracción de 17.5% de hSA. Por lo anterior se puede inferir que las células espermáticas portadoras del cromosoma sexual X sedimentan más rápido en la fracción de hSA al 17.5%; ya que son más pesados, el volumen de

su cabeza es mayor y contienen más ADN (van Munster *et al.*, 1999) comparativamente con las células espermáticas Y.

Lo anterior se cumple a un tiempo determinado ya que cuando se igualan los pesos de las células espermáticas, X y Y, con la hSA, los espermatozoides Y migran en sentido de la gravedad logrando entrar a una fracción de mayor concentración, gracias a la mayor movilidad que presentan (Ericsson *et al.*, 1973; Ollero *et al.*, 2000). De ser así, las subpoblaciones de espermatozoides, X de mayor peso y Y de mayor movilidad, no se logran separar de manera eficiente.

Para obtener machos, se han realizado diversas investigaciones, pero no han reportado desviaciones hacia la producción de hembras. Al inseminar ovejas Suffolk con espermatozoides de la fracción de hSA al 12.5%, Cortés y Flores (2008) reportaron 84.21% de machos ($p < 0.09$). En conejos (Hernández *et al.*, 2008) se produjeron 72.72% de machos al inseminar con espermatozoides de la fracción de hSA al 20%. En humanos, Beernink y Ericsson (1982) obtuvieron una desviación de 73% hacia el sexo masculino al inseminar mujeres con espermatozoides de la fracción de hSA al 20%.

Al comparar la eficiencia en la producción de hembras de las técnicas de sexado columnas de albúmina vs citometría de flujo se muestran diferencias en diversas especies de interés zootécnico. Mediante citometría de flujo se han obtenido hembras en 97, 95.3 y 93% para ovinos (Hollinshead *et al.*, 2002; de Graaf *et al.*, 2007; Bielby *et al.*, 2009); 87.8 y 90% para bovinos (Schenk *et al.*, 2006; Tubman *et al.*, 2004); y 92% para cerdos (Rath *et al.*, 1997).

El nivel de eficiencia de la citometría de flujo es superior a cualquier otra técnica, pero sus limitantes impiden que sea una tecnología de fácil acceso a cualquier productor (Garner y Seidel, 2008); sin embargo, con la técnica columnas de albúmina se puede lograr una menor desviación en la proporción de hembras, considerando que la metodología empleada y el costo son accesibles a cualquier productor.

Peso de corderos al nacimiento

El tipo de espermatozoides a inseminar en ovejas no influye ($p>0.05$) en el peso de los corderos Criollos al nacimiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Peso al nacimiento^z de corderos Criollos obtenidos mediante diferentes tipos de espermatozoides (tratamientos).

Tratamiento	Corderos	Peso, kg ($\bar{x}\pm EE$)
No sexados	19	2.83 $\pm$ 0.10 ^a
20% hSA	23	2.39 $\pm$ 0.18 ^a
17.5% hSA	26	2.92 $\pm$ 0.08 ^a

^z Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($p<0.05$).

Los pesos que se reportan coinciden con los reportados por Cortés y Flores (2008) quienes no encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el peso al nacimiento de corderos Suffolk obtenidos por espermatozoides: no sexados y sexados en las fracciones de hSA al 12.5 y 20% (3.95 vs 4.29 vs 3.81 kg, respectivamente).

De igual forma, Tubman *et al.* (2004) no encontraron diferencias significativas ($p>0.1$) en el peso de crías de vacas y vaquillas (de diversas razas cárnicas) inseminadas con semen no sexado y sexado (34.1 vs 33.9 kg) por la técnica de citometría de flujo.

Los resultados mencionados permiten inferir que el peso de las crías ovinas y bovinas no está influenciado por inseminar con semen no sexado o sexado, ni tampoco por la técnica de sexado empleada.

Prolificidad

La prolificidad en ovejas Criollas no varió ($p>0.05$) al ser inseminadas con tres tipos de espermatozoides (Cuadro 6).

Los resultados coinciden con los reportados por Cortés y Flores (2008), quienes obtuvieron prolificidad de 1.70 vs 1.58 vs 1.40 ($p>0.05$) al inseminar ovejas

Suffolk con espermatozoides no sexados y sexados en las fracciones de hSA al 12.5 y 20%, respectivamente. En humanos, Silverman *et al.* (2002) reportaron una prolificidad de 1.18 al inseminar con espermatozoides sexados provenientes de la fracción de hSA al 17.5%.

Cuadro 6. Prolificidad^z en ovejas Criollas inseminadas con diferentes tipos de espermatozoides (tratamientos).

Tratamiento	Ovejas Paridas	Corderos Nacidos	Prolificidad ($\bar{x} \pm EE$)
No sexados	14	19	1.36 $\pm$ 0.13 ^a
20% hSA	13	23	1.77 $\pm$ 0.23 ^a
17.5% hSA	17	26	1.53 $\pm$ 0.17 ^a

^z Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($p < 0.05$).

En ovinos (Beilby *et al.*, 2009) y en porcinos (Vázquez *et al.*, 2003) tampoco se reportaron diferencias significativas en prolificidad ($p > 0.05$), al inseminar con semen no sexado y sexado mediante la técnica citometría de flujo.

Los resultados de las investigaciones permiten inferir que la prolificidad no depende del tipo de semen a usar para inseminar ni de la técnica de sexado; posibles diferencias en prolificidad se puede atribuir al método de sincronización utilizado (Regueiro *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2004).

3.5.2 Resultados de laboratorio

Características seminales y patrón de movimiento espermático por tratamientos

En el Cuadro 7 se presenta la comparación entre los T1 y T2 al variar la concentración de hSA en la motilidad, viabilidad, concentración, VP, VC y VR.

La motilidad, viabilidad y concentración no fueron diferentes ($p > 0.05$) entre tratamientos, lo que permite inferir que el modificar la concentración de hSA de 20 a 17.5% no afecta las características seminales.

Cuadro 7. Características seminales y patrón de movimiento espermático al variar la concentración de hSA ($\bar{x} \pm EE$).

Variables	Tratamiento		Valor de <i>p</i>
	T1 (20% hSA)	T2 (17.5% hSA)	
Características seminales			
Motilidad, %	51.67±5.14	65.00±5.14	0.14
Viabilidad, %	55.67±3.13	65.33±3.13	0.09
Concentración, 10 ⁶ mL ⁻¹	37.00±7.00	27.67±7.00	0.39
Patrón de movimiento espermático			
Velocidad promedio, μm segundo ⁻¹	138.47±5.91	138.27±5.91	0.98
Velocidad curvilínea, μm segundo ⁻¹	192.10±6.76	192.58±6.76	0.96
Velocidad rectilínea, μm segundo ⁻¹	123.25±6.15	123.77±6.15	0.95

Las velocidades promedio, curvilínea y rectilínea no fueron diferentes ($p > 0.05$) entre tratamientos, lo cual permite inferir que el modificar la concentración de hSA de 20 a 17.5% no afecta el patrón de movimiento espermático.

Estos resultados se pueden traspolar y coinciden a nivel de campo, donde al inseminar con los espermatozoides de ambos tratamientos no se observaron diferencias en cuanto a fertilidad.

Características seminales por ensayo

En el Cuadro 8 se presentan la motilidad, viabilidad y concentración espermática para cada fracción de la columna de hSA por ensayo.

Motilidad

La motilidad mostró cambios ($p < 0.05$) entre la muestra control (A) y las fracciones de hSA (B, C y D) en ambos ensayos. Las fracciones A y B presentan la mayor y menor motilidad, en los ensayos 1 y 2; esto se atribuye a que la primera es la muestra control y no se fue sometida al proceso de sexado,

y la segunda es la fracción residual donde están los espermatozoides que no pudieron migrar a las fracciones de mayor concentración de hSA.

Cuadro 8. Medias^z para características seminales de cada fracción en la columna de hSA al variar la concentración de hSA.

Fracción	Características seminales		
	Motilidad (%)	Viabilidad (%)	Concentración (10 ⁶ mL ⁻¹)
Ensayo 1			
A ^y	85.00 ^a	69.00 ^a	2956.67 ^a
B ^x	3.33 ^b	20.00 ^b	171.67 ^b
C ^w	60.00 ^c	58.00 ^c	89.67 ^{bc}
D ^v	51.67 ^c	55.67 ^c	37.00 ^c
Valor de <i>p</i>	0.0001	0.0001	0.0001
EE de la media	5.14	2.62	29.54
Ensayo 2			
A ^y	85.00 ^a	69.00 ^a	2956.67 ^a
B ^x	5.00 ^b	18.00 ^b	201.33 ^b
C ^w	65.00 ^c	57.00 ^c	71.00 ^c
D ^u	65.00 ^c	65.33 ^{ac}	27.67 ^c
Valor de <i>p</i>	0.0001	0.0001	0.0001
EE de la media	2.50	3.28	29.30

^z Medias sin una letra en común, dentro de columnas dentro de ensayo, son diferentes ($p < 0.05$).

^y muestra control, ^x fracción residual, ^w fracción al 12.5% de hSA, ^v fracción al 20% de hSA, ^u fracción al 17.5% de hSA.

Entre las fracciones C y D dentro de cada ensayo, no se observan diferencias en la motilidad, lo cual permite inferir que la diferencia entre los gradientes de esas fracciones (7.5% en el ensayo 1 y 5% en el ensayo 2) no altera el movimiento de las células espermáticas.

En el ensayo 2, la motilidad de las fracciones B, C y D fue mayor en 7.69, 20.51 y 33.44%, respectivamente, al compararla con la motilidad de las fracciones del ensayo 1.

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

En conejos, Hernández *et al.* (2008) reportaron 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, lo cual no coincide con los resultados obtenidos en esta investigación; 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 B, C y D 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. 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%.

Viabilidad

La viabilidad fue mayor en la fracción A y menor en la fracción B ($p < 0.05$) en ambos ensayos. La misma tendencia en viabilidad se observa entre ensayos con excepción de la fracción D, en donde el porcentaje de espermatozoides vivos fue mayor en el ensayo 2 e igual a de la fracción A en el mismo ensayo. Estos resultados permiten inferir que la técnica de sexado afecta la viabilidad de los espermatozoides.

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

Hernández *et al.* (2008) encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) en la viabilidad de espermatozoides de conejo (90, 89, 88 y 83%) con semen no sexado y con las fracciones de 10, 15 y 20% de hSA. De igual forma, a medida que aumenta la concentración de hSA disminuye la viabilidad, lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación. La única fracción que presentó menor ($p<0.05$) porcentaje de viabilidad fue la residual; y al igual que en la motilidad, en dicha fracción se espera que se encuentren las células no viables.

Al separar a los espermatozoides mediante citometría de flujo, la viabilidad no se ve afectada ya que en dicha metodología se selecciona a las células espermáticas sin daños en la membrana o el acrosoma; estudios con semen bovino han reportado 60% de viabilidad espermática (Blondin *et al.*, 2009).

Concentración

La concentración espermática fue diferente ($p<0.05$) entre las fracciones A, B, C y D en cada ensayo. La diferencia entre las fracciones B, C y D vs A es debida a que en la columna de hSA la concentración espermática de la muestra de semen que se coloca sobre el gradiente es de 300×10^6 .

Entre ensayos se observa una tendencia similar en la distribución de los espermatozoides en la columna de hSA con excepción de la fracción C en el ensayo 1; esto puede atribuirse a que al momento de separar las fracciones B y C se tomó una menor cantidad de espermatozoides de la B.

La distribución de espermatozoides de carnero en las fracciones de hSA no ha sido caracterizada; por lo que los resultados fueron comparados con otras especies.

La manera en como se distribuyen los espermatozoides en las fracciones de albúmina (ensayo 1: B 57%, C 30% y D 12%; ensayo 2: B 67%, C 24% y D 9%) es similar a la distribución observada por Flores *et al.* (2010); quienes reportaron 67, 18 y 15% de espermatozoides de conejo en las fracciones residual, 12.5 y 17.5% de hSA. Hernández *et al.* (2008) encontraron 46, 34 y

20% de espermatozoides de conejo en las fracciones de 10, 15 y 20% de hSA; 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 esta investigación.

La forma en que se distribuye la concentración espermática permite inferir que sólo pocos espermatozoides son capaces de atravesar fracciones de hSA a una alta concentración (17.5 o 20%), ayudados por su peso o su facilidad de movimiento (van Munster *et al.*, 1999; Ollero *et al.*, 2000).

Patrón de movimiento espermático por ensayo

En el Cuadro 9 se presentan la VP, VC y VR para cada fracción de la columna de hSA por ensayo.

Velocidad promedio

La concentración de hSA en cada fracción influyó ($p < 0.05$) en la velocidad promedio de espermatozoides no sexados y sexados.

En los dos ensayos, la VP de la fracción A es superior a la VP de las demás fracciones. La fracción B difiere ($p < 0.05$) de las fracciones A, C y D, debido a que contiene a los espermatozoides que no pueden migrar a las demás fracciones; ya sea porque no son viables o carecen de motilidad. La VP de las fracciones A, B, C y D sigue la misma tendencia en los ensayos 1 y 2.

Los resultados no coinciden con los mencionados por Flores *et al.* (2010) en conejos, ya que reportan velocidades bajas (60 a 90 $\mu\text{m segundo}^{-1}$) en las fracciones residual vs 12.5% de hSA, y 12.5 vs 17.5% de hSA al compararlas con las resultantes en esta investigación. Esto se puede atribuir a las diferentes características seminales entre especies (Nervo, 2005).

Cuadro 9. Medias^z para patrón de movimiento espermático de cada fracción en la columna de hSA al variar la concentración de hSA.

Fracción	Patrón de movimiento espermático ($\mu\text{m segundo}^{-1}$)		
	Velocidad promedio	Velocidad curvilínea	Velocidad rectilínea
Ensayo 1			
A ^y	161.18 ^a	244.72 ^a	133.02 ^a
B ^x	116.12 ^b	187.17 ^b	98.02 ^b
C ^w	139.30 ^c	208.63 ^b	121.67 ^a
D ^v	138.47 ^c	192.10 ^b	123.25 ^a
Valor de <i>p</i>	0.0030	0.0003	0.0119
EE de la media	7.20	8.13	6.83
Ensayo 2			
A ^y	161.18 ^a	244.72 ^a	133.02 ^a
B ^x	122.63 ^b	195.60 ^{bc}	108.40 ^b
C ^w	149.58 ^{ac}	218.10 ^b	130.40 ^a
D ^u	138.27 ^c	192.58 ^c	123.77 ^a
Valor de <i>p</i>	0.0004	0.0003	0.0103
EE de la media	5.26	7.63	4.98

^z Medias sin una letra en común, dentro de columnas dentro de ensayo, son diferentes ($p < 0.05$).

^y muestra control, ^x fracción residual, ^w fracción al 12.5% de hSA, ^v fracción al 20% de hSA, ^u fracción al 17.5% de hSA.

Velocidad curvilínea

La VC de los espermatozoides en la fracción A fue mayor ($p < 0.05$) comparada con la VC de las fracciones B, C y D. La velocidad curvilínea de las fracciones B, C y D de ambos ensayos presenta una tendencia similar.

Al igual que en la VP, los resultados de la VC no coinciden con los reportados por Flores *et al.* (2010) en conejos, a pesar de que encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre las fracciones residual, 12.5 y 17.5% de hSA, reportan

velocidades de 50 a 70 $\mu\text{m segundo}^{-1}$. Por lo que las diferencias se atribuyen a las diferentes características seminales entre especies (Nervo, 2005).

A pesar de las diferencias de VP, VC y VR en las fracciones B, no se puede inferir que la técnica columnas de albúmina modifique el patrón del movimiento espermático. Esta investigación puede dar pauta a futuros estudios con la finalidad de caracterizar el movimiento de los espermatozoides sexados y poder identificar subpoblaciones de espermatozoides portadores del cromosoma sexual X y Y.

Velocidad rectilínea

Al comparar la velocidad rectilínea de las fracciones A, C y D de ambos ensayos, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$). La VR de la fracción B es menor debido a que en ella se encuentran los espermatozoides con menor capacidad de movimiento e inmóviles.

Los resultados de VR no coinciden con los reportados por Flores *et al.* (2010) para la fracción residual que presenta mayor ($p<0.05$) velocidad comparada con las fracciones al 12.5 y 17.5% de hSA (140 vs 110 vs 90 $\mu\text{m segundo}^{-1}$, respectivamente); pero el intervalo de velocidades es similar al de las demás fracciones.

3.6 Conclusión

La concentración de albúmina sérica humana en semen de carnero modificó la proporción de sexos al nacimiento en corderos Criollos; también, la motilidad, viabilidad, concentración, y velocidades promedio y curvilínea de los espermatozoides. Sin embargo, no modificó la fertilidad y prolificidad de ovejas Criollas, ni el peso de los corderos al nacimiento; así como tampoco la velocidad rectilínea de los espermatozoides.

3.7 Agradecimientos

Al Laboratorio del Área de Reproducción Animal Asistida del Departamento de Biología de la Reproducción en la UAM-I y a la Granja Experimental del Departamento de Zootecnia de la UACH, por las facilidades otorgadas para realizar esta investigación.

3.8 Literatura citada

- Beal, W. E., L. M. White, and D. L. Garner. 1984. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient. *Journal of Animal Science* 58: 1432-1436.
- Beernink, F. J., and R. J. Ericsson. 1982. Male sex preselection through sperm isolation. *Fertility and Sterility* 38: 493-495.
- Beernink, F. J., W. P. Dmowski, and R. J. Ericsson. 1993. Sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertility and Sterility* 59: 382-386.
- Beilby, K. H., C. G. Grupen, P. C. Thomson, W. M. C. Maxwell, and G. Evans. 2009. The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. *Theriogenology* 71: 829-835.
- Blondin, P., M. Beaulieu, V. Fournier, N. Morin, L. Crawford, P. Madan, and W. A. King. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71: 30-38.
- Claasens, O. E., C. J. Oosthuizen, J. Brusnick, D. R. Franken, and T. Kruger. F. 1995. Fluorescent in situ hybridization evaluation of human T-bearing spermatozoa separated by albumin density gradients. *Fertility and Sterility* 63: 417-418.
- Cortés V., P., R. Rangel S., C. A. Apodaca S., y J. Ayala O. 2007. Sexado de semen ovino utilizando la técnica columnas de albúmina para obtener machos. *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. pp: 392-394.
- Cortés V., P., y P. S. Flores M. 2008. Sexado de semen ovino utilizando la técnica columnas de albúmina. Tesis de Licenciatura. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México. 31 p.
- de Graaf, S. P., G. Evans, W. M. C. Maxwell, D. G. Cran, and J. K. O'Brien. 2007. Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 67: 391-398.
- Ericsson, R. J., C. N. Langevin, and M. Nishino. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 246: 421-424.

- Evans, G., F. K. Hollinshead and, and W. M. C Maxwell. 2004. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reproduction Fertility and Development* 16: 455-464.
- 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. pp: 395-397.
- Flores, P. S. M., P. Cortés V., E. Arenas R., D. A. Ambriz G., R. Rodríguez de L., y R. Rangel S. 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. 21 al 23 de octubre. p. 73-77.
- García, E. 1981. Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 3 ed. UNAM (ed.). México. 132 p.
- Garner, D. L., and Seidel, G. E. Jr. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69: 886-895.
- Hafez, E. S. E., and B. Hafez. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7 ed. Mc Graw Hill (ed.). México. 519 p.
- Hernández, P. J. E., R. F. Fernández, C. J. Reyes, P.G Cerezo, J. L. Echegaray, y B. Mendoza. 2008. Separación de espermatozoides "Y" de eyaculado de conejo por medio de gradientes de densidad de albúmina sérica humana. *Revista de Salud Animal* 30: 45-49.
- Hollinshead, F. K., J. K. O'Brien, W. M. C. Maxwell, and G. Evans. 2002. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome bearing spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 14: 503-508.
- Killen, I. D., and G. J. Caffery. 1982. Uterine Insemination of ewes with the aid of laparoscope. *Australian Veterinary Journal* 59: 95 (Abstr.).
- López, V., E. Maneiro, M. Navarro, y E. Costas. 1992. Nuevas aproximaciones al estudio de los espermatozoides: aspectos hidrodinámicos de la movilidad espermática. *Archivos de Zootecnia* 41: 219-230.
- Mc Donald, S., y D. Burns. 1978. Propiedades de los líquidos. *In: Física para las Ciencias de la Vida y de la Salud*. Fondo Educativo Interamericano (ed.). pp: 159-186.
- Nervo, T. 2005. Características medias del eyaculado del conejo tras una recogida del semen semanal. *Cunicultura* 30: 173-174.
- Ollero, M., R. Perez-Pé, I. Gargallo, S. Morlanes, J. Osada, T. Muiño-Blanco, and J. Cebrian-Perez. 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.

- Rath, D., L. A. Johnson, J. R. Dobrinsky, G. R. Welch, and H. Niemann. 1997. Production of piglets preselected for sex following *in vitro* fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology* 47: 795-800.
- Regueiro, M., R. Pérez C., A. Ganzábal, M. Aba, and M. Forsberg. 1999. Effect of medroxyprogesterone acetate and eCG treatment on the reproductive performance of dairy goats. *Small Ruminant research* 33: 223-230.
- Rodríguez-Almeida, F. A., C. O. Ávila C., A. Anchondo G., B. Sánchez-Ramírez, y J. A. Jiménez C. 2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia* 42: 399-406.
- Schenka, T. K., T. K. Suhb, and G. E. Seidel. 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65: 299-307.
- SAS 9.1 (2004).
- Schenk J. L., T. K. Suh, and G. E. Seidel. 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65: 299-307.
- Seidel, G. E., J. L. Schenk, L. A. Herickhoff, S. P. Doyle, Z. Brink, R. D. Green, and D. G. Cran. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52: 1407-1420.
- Silverman, A. Y., S. R. Stephens, M. T. Drouin, R. G. Zack, J. Osborne, and S. A. Ericsson. 2002. Female sex selection using clomiphene citrate and albumin separation of human sperm. *Human Reproduction* 17: 1254-1256.
- Tubman, L. M., Z. Brink, T. K. Suh, and G. E. Seidel. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *Journal of Animal Science* 82: 1029-1036.
- van Munster, E., J. Stap, R. A. Hoebe, G. te Meerman, and J. Aten. 1999. Difference in volume of X- and Y- chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content. *Cytometry* 35: 125-128.
- Vázquez, J. M., E. A. Martínez, I. Parrilla, J. Roca, M. A. Gil, and J. L. Vázquez. 2003. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1605-1614.
- Xu, J., S. A. Chaubal, and F. Du. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 71: 39-47.