

Sexado de espermatozoides en ganado lechero (Holstein) mediante microscopía confocal y tinción DAPI

Felipe Fornelli Martin del Campo¹, Edgar Ramírez Rodríguez¹, Raymundo Rivas Cáceres¹, Eduardo José Loera Ochoa¹.

¹Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Resumen

La habilidad de preseleccionar el sexo de los animales se ha convertido el principal objetivo en la industria ganadera. Actualmente, el único método efectivo para separar espermatozoides en las fracciones portadoras del cromosoma –X y –Y es mediante Citometría de flujo. Sin embargo, su elevado costo y baja disponibilidad en laboratorios ha fomentado la búsqueda de nuevos métodos de sexado. En este estudio se utilizaron muestras de semen de toro Holstein y se evaluó mediante microscopía confocal, las medidas morfométricas de la cabeza espermática y la diferencia relativa del contenido de ADN a través de mediciones en el tamaño del núcleo celular teñido con DAPI en semen sin sexar y semen –X sexado por Citometría de flujo. Se realizó un pronóstico del sexo de los espermatozoides en una muestra no sexada, se compararon los datos entre las diferentes muestras por medio del estadístico conglomerado de K medias con el fin de diferenciar las subpoblaciones espermáticas. Los resultados muestran que mediante las mediciones del tamaño del núcleo es posible identificar el sexo del espermatozoide en una muestra de semen no sexado, siendo lo opuesto con las medidas morfométricas de la cabeza espermática.

Palabras clave: Preselección del sexo, Holstein, microscopía confocal, DAPI, K medias.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de seleccionar el sexo en animales es el objetivo más buscado, más estudiado e incluso, el más incomprendido dentro de las biotecnologías reproductivas (Garner y Seidel, 2008; Guerino *et al.*, 2013), y actualmente juega un papel económico

preponderante en los programas de crianza en la industria lechera y de la producción de carne (Habermann *et al.*, 2005; Malik, 2011; Wang *et al.*, 2011; De Vries *et al.*, 2008), permitiendo satisfacer la tasa de mejoramiento genético, la eficiencia reproductiva, y la demanda

actual del mercado (Palma y Brem, 2001; Parati *et al.*, 2006). En este contexto, la separación de espermatozoides bovinos en subpoblaciones portadoras del cromosoma -X y -Y, adquiere especial interés al combinarse con otras biotecnologías como la inseminación artificial (AI), fertilización *in vitro* (IVF), ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) (Nieman *et al.*, 2011; Rath *et al.*, 2013). A pesar de que se han desarrollado diferentes métodos para la determinación del sexo en espermatozoides, el único método efectivo para la rutina es mediante Citometría de Flujo (Quan *et al.*, 2014), el cual separa las fracciones espermáticas con base en la diferencia en el contenido de ADN entre espermatozoides

portadores del cromosoma -X y -Y. Sin embargo, la baja tasa de preñez y producción de embriones utilizando espermatozoide sexado por Citometría de flujo, su elevado costo y baja disponibilidad han fomentado la búsqueda de métodos alternativos de sexado (Carvalho *et al.*, 2014). Por ello en este estudio se evaluó mediante microscopía confocal, la posible diferencia en el tamaño de la cabeza espermática entre espermatozoides portadores del cromosoma -X y -Y así como las diferencias en el contenido de ADN midiendo el núcleo celular teñido con DAPI, que en conjunto permitieran identificar el sexo del espermatozoide correctamente.

METODOLOGIA

Obtención de las muestras

Las muestras de semen se obtuvieron por un donador humano el cual tras ser informado dio su consentimiento para su fin de identificar las poblaciones de espermatozoides que nos permitirán.

Lavado de las muestras

El lavado de las muestras para eliminar los componentes no deseados se realizó depositando cada muestra en un tubo Falcon graduado de 5 ml y se diluyó en medio BO-IVC (EmbryoTrans Biotech) en proporción 1:2. de aquí se pasó a centrifugar 1500 rpm durante 6 minutos (IEC clinical Centrifuge, International Equipment Company, EUA). Se extrajo

el sobrenadante con una pipeta Pasteur de 5 ml, se resuspenderán los botones formados en 3 ml de BO-IVC y se transferirán las muestras a tubos Eppendorf de 1.5 ml donde se rotuló la procedencia de la muestra en semen sin sexar y semen sexado.

Preparación del DAPI

Se preparó el reactivo DAPI de acuerdo al protocolo del proveedor (TermoFisher Scientific) a todo el contenido del recipiente contenedor con DAPI para tener un stock de 14.3 mM (5 mg/mL) y se almacenó a 4°C. En 100 µL de buffer fosfato salino (PBS) se añadió 2.1 µL de la solución de stock de DAPI, generando una dilución intermedia de 300 µM. Se

diluyó la concentración de DAPI de 300 μM en PBS en una relación 1: 1000, obteniendo una solución de tinción DAPI de 300 nM; el contenedor se cubrió con aluminio para protegerlo de la luz y la solución final fue almacenada a 4°C.

Preparación de laminillas

Se colocó en un portaobjetos 10 μl de muestra con una micropipeta (Accumax), posteriormente se añadió 10 μl del marcador fluorescente DAPI para observar el núcleo espermático aquí se pasó a colocar el cubreobjetos se dejó reposar 15 minutos con el fin de que este penetrará la membrana dentro de las células y se unirá al DNA nuclear permitiendo que aumente la intensidad de la fluorescencia para permitir una mejor observación esto se selló con barniz de uñas transparente en los bordes del cubreobjetos.

Observación en el microscopio confocal y captura de fotos

Las laminillas fueron examinadas con un microscopio invertido de contraste

diferencial de interferencia (DIC) (Axio Observer Z.1, Zeiss), utilizando un objetivo a 40x de contraste de fases (Plan-Apochromat 40x, sin aceite de inmersión, 0.95 Korr) para observar la morfología espermática. Las fotografías fueron tomadas utilizando la cámara integrada del microscopio (AxioCam MRc3 4564) con una resolución de color de 16-Bit (Figura 2A). Las imágenes fueron almacenadas en formato .CZI. Una vez tomada la fotografía en contraste de fases, el microscopio fue adaptado al modo fluorescente removiendo los prismas de DIC e insertando en su lugar el filtro para DAPI (Set de filtro 49, excitación G 365, divisor de haz FT 395, emisión BP 445/50, Zeiss), utilizando una lámpara de arco de mercurio en lugar de una haz láser. Se tomaron fotografías fluorescentes del núcleo de los espermatozoides para detectar el contenido de ADN, correspondientes a cada campo tomado en contraste de fases (Figura 2B). Por último se solaparon las imágenes correspondientes tomadas con microscopía fluorescente y contraste de fases (Figura 2C).

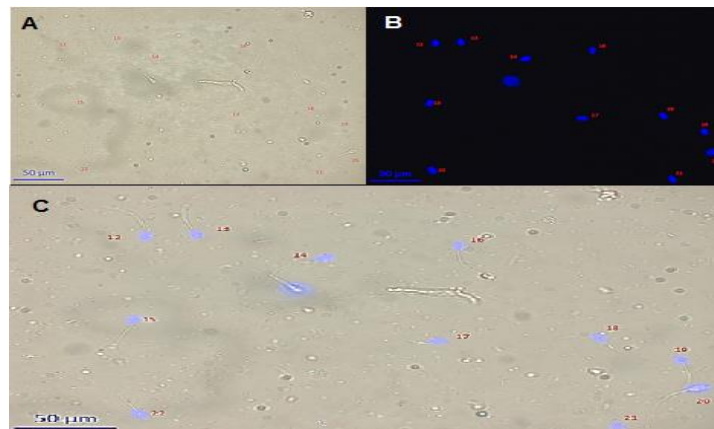


Figura 1. Fotografías en el mismo campo de visión observados a 40x de una muestra de espermatozoides sexados por CF. (A) Espermatozoides observados en contraste de fase. (B) Núcleo espermático teñido con DAPI observado con fluorescencia. (C) Solapamiento de las fotografías (A) y (B).

Captura de datos y generación de una base de datos

Las fotografías fueron analizadas con el programa de análisis de microscopía Zen 2012 Blue Edition, en el cual se enumeró cada espermatozoides presente en las fotografías, se midió con la función de regla del programa, el largo y el ancho expresado en micrómetros (μm) de la intensidad de la fluorescencia del ADN de cada espermatozoide, así como el largo y el ancho de la cabeza del espermatozoide. Se discriminaron todos aquellos espermatozoides cuya cabeza no se encontraba orientada hacia la parte plana, y a los espermatozoides que fueran apreciables en alguno de los campos correspondientes respecto a las fotografías de la microscopía fluorescente y la microscopía confocal. Con las mediciones obtenidas se generó una base de datos en Microsoft Excel 2013.

Análisis e interpretación de datos

Posteriormente, la base de datos generada en Microsoft Excel 2013 fue exportada al programa de analítica predictiva SPSS v.20.0. (IBM, 2011) para ser analizada. Se realizó la estadística descriptiva de los datos del semen no sexado y del sexado por CF; se analizará la distribución de los datos de cada variable en ambos tipos de muestras mediante la prueba de

normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, utilizando como referencia los valores obtenidos en la estadística descriptiva del semen sexado para el ancho y largo del contenido de ADN en el núcleo evidenciado por DAPI, se pronosticó el sexo de cada espermatozoide presentes en el semen no sexado. Con el fin de observar si el contenido de ADN puede afectar el volumen de la cabeza espermática se efectuó la correlación de Pearson si los datos presentan una distribución normal, y de Spearman cuando alguna de las variables no la presenta. Las correlaciones se realizaron en los grupos de espermatozoides sexados, así como en los espermatozoides pronosticados como machos y como hembras, y en todo el conjunto de datos; se correlacionaron las siguientes variables: largo del núcleo y el largo de la cabeza, ancho del núcleo y ancho de la cabeza, largo del núcleo y ancho de la cabeza, ancho del núcleo y largo de la cabeza. La separación de los espermatozoides se llevó a cabo mediante el análisis de conglomerados de K medias realizando 10 iteraciones por análisis, este estadístico permite agrupar los datos de diferentes variables en función de su similitud además de poseer una alta flexibilidad al permitir incluir variables categóricas (sexo del espermatozoide) y no asumir ninguna distribución específica para las variables.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 358 espermatozoides de humanos, correspondientes a 148 espermatozoides provenientes de muestras sexadas por CF, 210 espermatozoides de muestras sin sexar, de los cuales 102 fueron pronosticados como machos (portadores del cromosoma -Y), y 108 pronosticados como hembras (portadores del cromosoma -X).

Estadística descriptiva

Para cada grupo se analizaron los datos del ancho y largo del núcleo del

espermatozoide, y el ancho y largo de la cabeza espermática. Las medias del muestra formado por espermatozoides sexados por CF fueron: 5.04, 9.56, 4.76, y 9.59 μm respectivamente con una desviación típica de 0.051, 0.065, 0.054, 0.07 μm . Dichos valores fueron utilizados como referencia para pronosticar el sexo de los espermatozoides de muestras no sexadas. La normalidad de los datos de cada muestra se muestra en la tabla II. El grado de relación entre variables para cada tipo de muestra se puede observar en la tabla II.

Tabla I. Distribución normal de cada variable en las diferentes muestras. Las variables que presentan una distribución normal están marcadas con X, aquellas que no presentan una distribución normal se encuentran marcadas con O.

Variables				
Muestra	ancho-núcleo	largo-núcleo	ancho-cabeza	largo cabeza
Semen sexado	X	X	X	O
-X pronosticados	X	O	X	X
-Y pronosticados	X	X	X	X
Conjunto (todos los datos)	X	O	X	O

Nivel de significancia $\alpha=0.01$ (Bilateral).

Tabla II. Correlación lineal entre las diferentes variables correspondientes a cada muestra.

Variables				
Grupo	ancho-núcleo	largo-núcleo	ancho-cabeza	largo cabeza
Semen sexado	0.445*	^s 0.459*	0.239	^s 0.131
Hembras pronosticadas	0.585**	^s 0.233	^s 0.284	-0.087
Machos pronosticados	0.333	-0.025	0.096	-0.015
Conjunto (todos los datos)	0.453*	^s 0.012	^s 0.028	^s -0.053

**Existe una correlación moderada alta entre las variables. *Existe una correlación moderada entre las variables. Nivel de significancia $\alpha=0.01$. ^s Rho de Spearman utilizada cuando una de las variables no presenta una distribución normal.

Análisis de conglomerados

Se llevó a cabo un análisis de conglomerados de K medias con el fin de agrupar los datos en dos grupos, un grupo correspondiente a espermatozoides -X y otro correspondiente a espermatozoides -Y.

En la figura 2 se analizó el largo y el ancho del núcleo de los espermatozoides de las muestras de semen no sexado, formando dos conglomerados bien diferenciados uno del otro, lo cual indicaría la separación de los espermatozoides debido a una tinción diferencial de dos subpoblaciones,

correspondientes a espermatozoides machos y hembras. En el cual, el grupo 1 correspondería a la fracción -X, y el grupo 2 a la fracción -Y.

En la figura 2 se analizó el largo y el ancho del núcleo de los espermatozoides de las muestras de semen no sexado, formando dos conglomerados bien diferenciados uno del otro, lo cual indicaría la separación de los espermatozoides debido a una tinción diferencial de dos subpoblaciones, correspondientes a espermatozoides machos y hembras. En el cual, el grupo 1 correspondería a la fracción -X, y el grupo 2 a la fracción -Y.

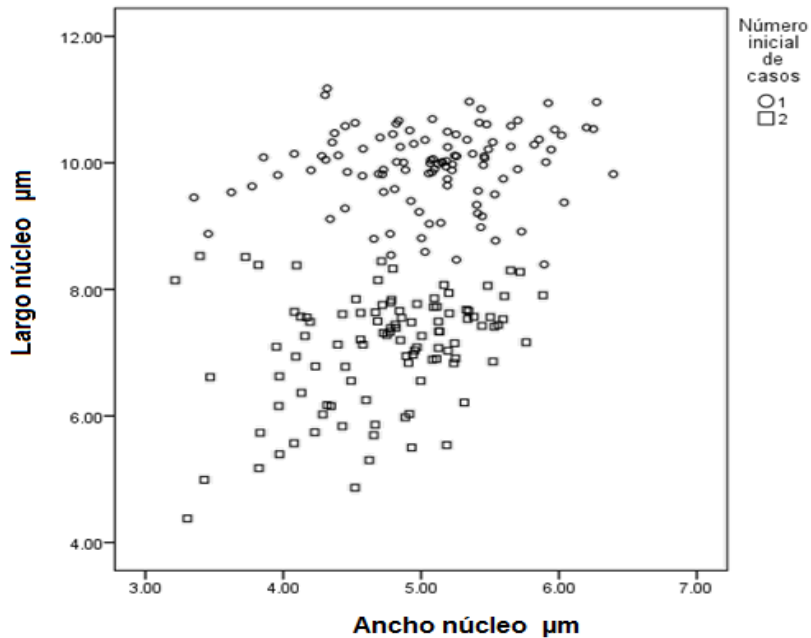


Figura 2. Estructura de conglomerados del contenido de ADN en mediciones del largo y ancho del núcleo espermático en una muestra de semen no sexado, en la cual 106 espermatozoides se agrupan en el conglomerado 1, y 104 en el conglomerado 2. El centro de los conglomerados finales fue de 5.07 μm y 4.73 μm para el ancho del núcleo, 9.94 μm , 7.08 μm para el largo del núcleo en el conglomerado 1 y 2 respectivamente.

Al analizar las variables morfométricas del largo y del ancho de la cabeza espermática en muestras sin sexar observamos que los datos son más

homogéneos entre sí, por lo que la estructura de los conglomerados no se encuentra bien diferenciada, lo cual puede observarse en la figura 3.

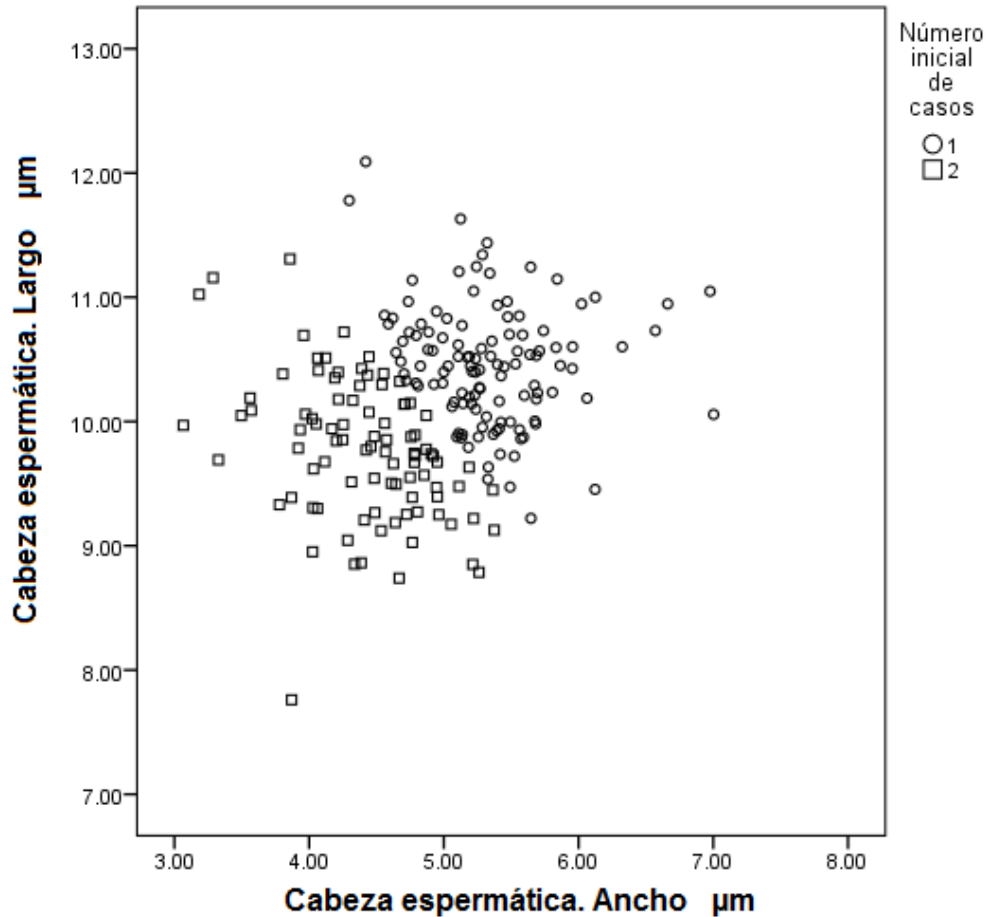


Figura 3. Formación de dos conglomerados de espermatozoides no sexados basados en las medidas morfométricas del largo y ancho de la cabeza espermática, 118 espermatozoides son agrupados en el conglomerado 1 y 92 en el conglomerado 2. Los centros de los conglomerados finales fue de 5.33 μm y 4.42 μm para el ancho de la cabeza, 10.46 μm y 9.77 μm para el largo, correspondientes a los conglomerados 1 y 2 respectivamente.

Tomando como grupo control las medidas de los espermatozoides sexados por CF se compararon las medidas de espermatozoides pronosticados como hembras de las muestras no sexadas, utilizando como criterio tanto el

contenido de ADN (figura 4), como la cabeza espermática (figura 5). En ambos casos la dispersión de los datos de los dos grupos se solapa, la homogeneidad de los grupos indicaría un pronóstico acertado en la determinación del sexo.

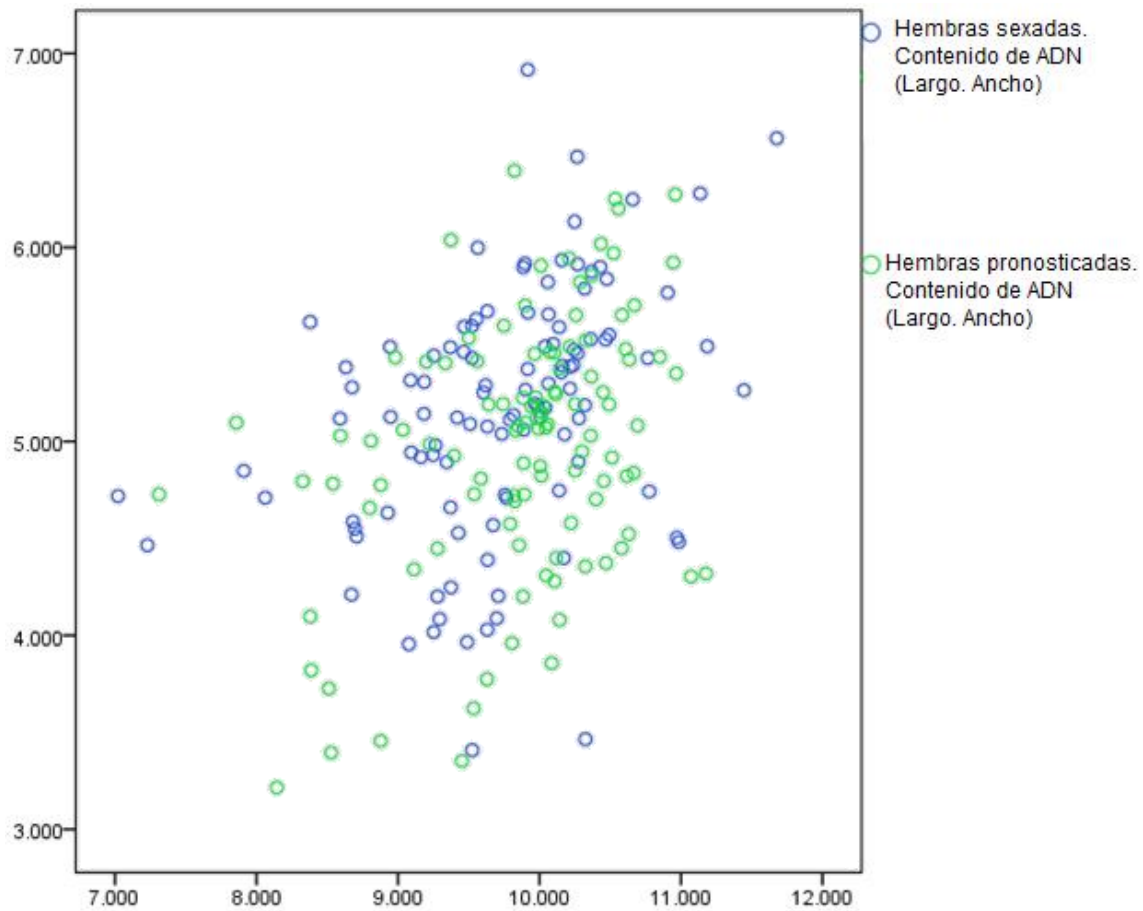


Figura 4. Comparación entre espermatozoides hembra sexados por CF, con espermatozoides sin sexar pronosticados hembra, basados en el contenido de ADN. 108 datos corresponden a los espermatozoides pronosticados hembras, y 149 datos corresponden al grupo control.

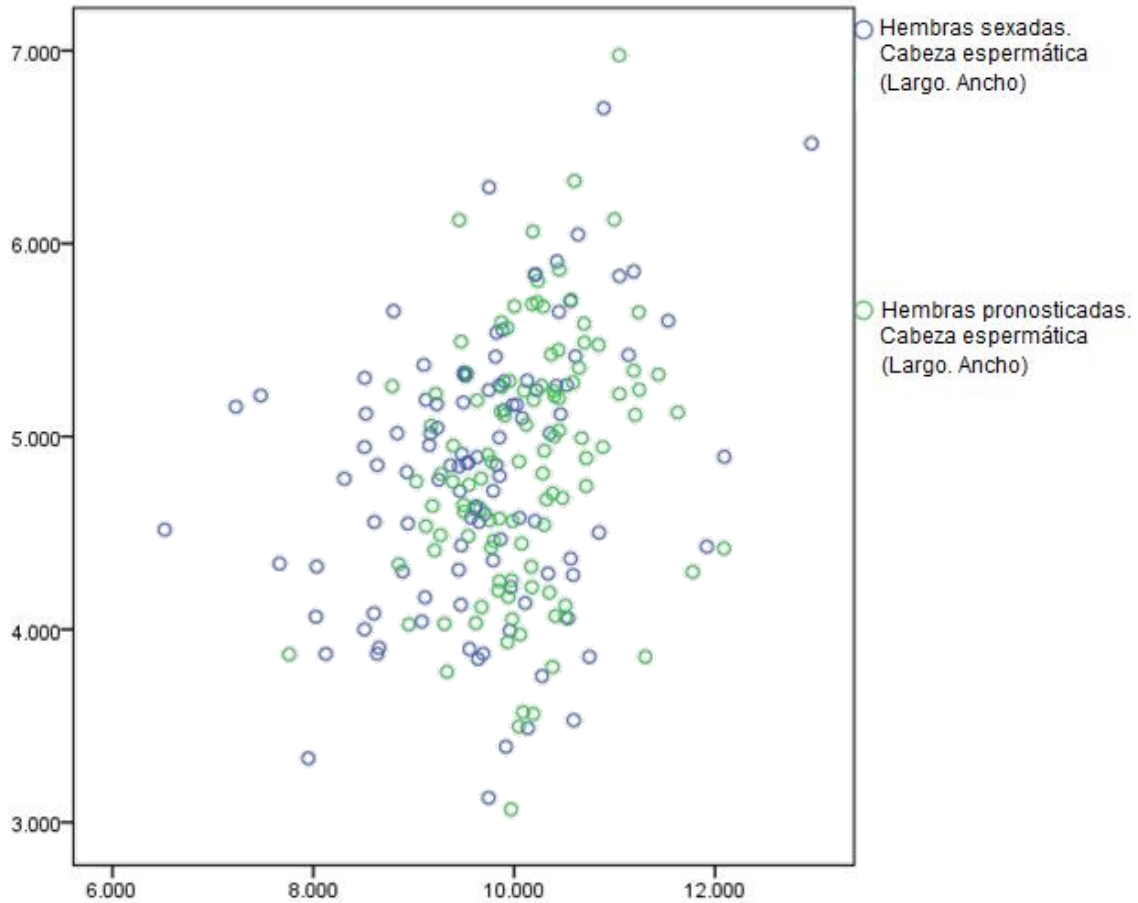


Figura 5. Comparación entre espermatozoides hembra sexados por CF, con espermatozoides sin sexar pronosticados hembra, basados en el largo y ancho de la cabeza del espermatozoide. 108 datos corresponden a los espermatozoides pronosticados hembras, y 149 datos corresponden al grupo control.

Se comparó el grupo control con los espermatozoides pronosticados como machos en las muestras sin sexar, cuando el criterio de los datos fue el núcleo de los espermatozoides se obtuvieron dos conglomerados bien definidos uno del otro (Figura 6), sin embargo al utilizar

como criterio las medidas morfométricas de la cabeza, los grupos se traslapan unos con otros (figura 7), lo que indicaría que utilizando solamente la cabeza del espermatozoide no es posible discernir entre las dos subpoblaciones.

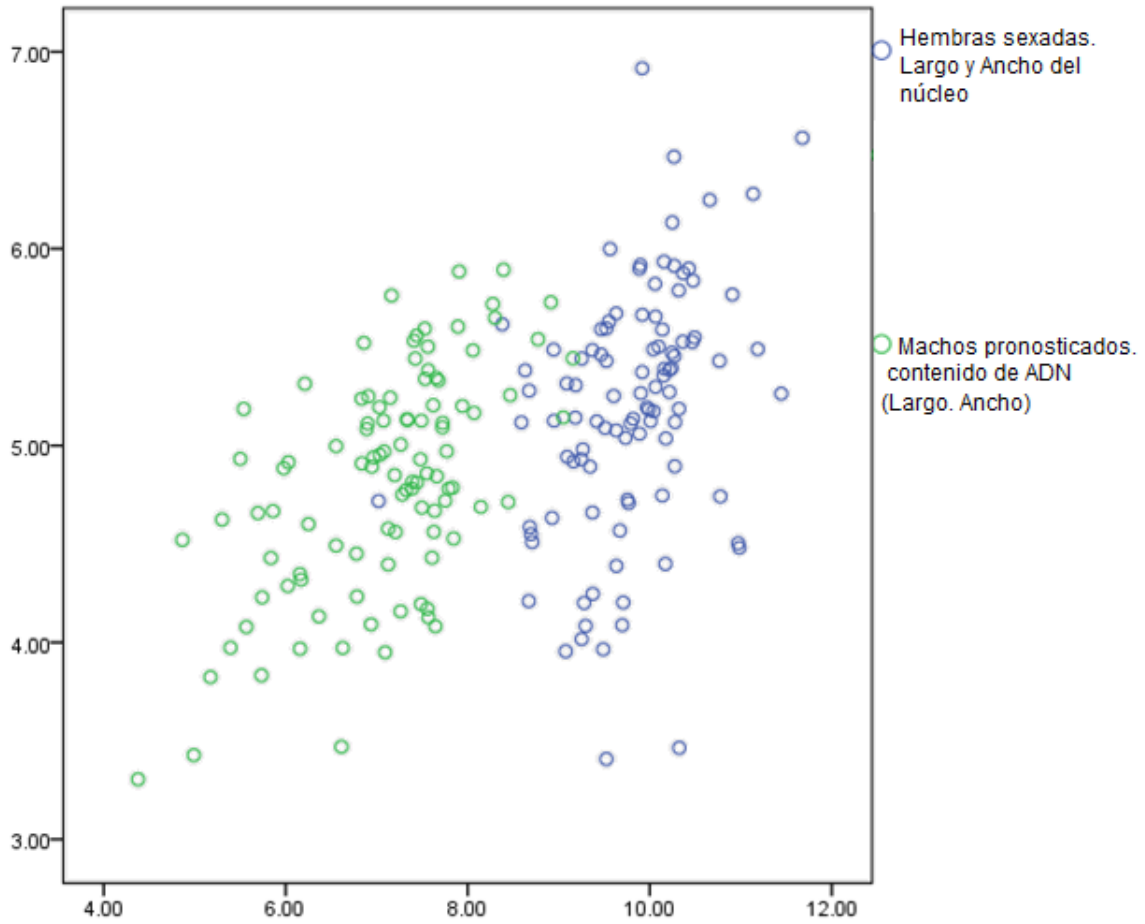


Figura 6. Comparación entre espermatozoides hembras sexadas por CF y espermatozoides pronosticados machos de las muestras sin sexar, basados en el contenido de ADN. 149 datos corresponden a los espermatozoides sexados, 102 datos corresponden a los espermatozoides pronosticados macho.

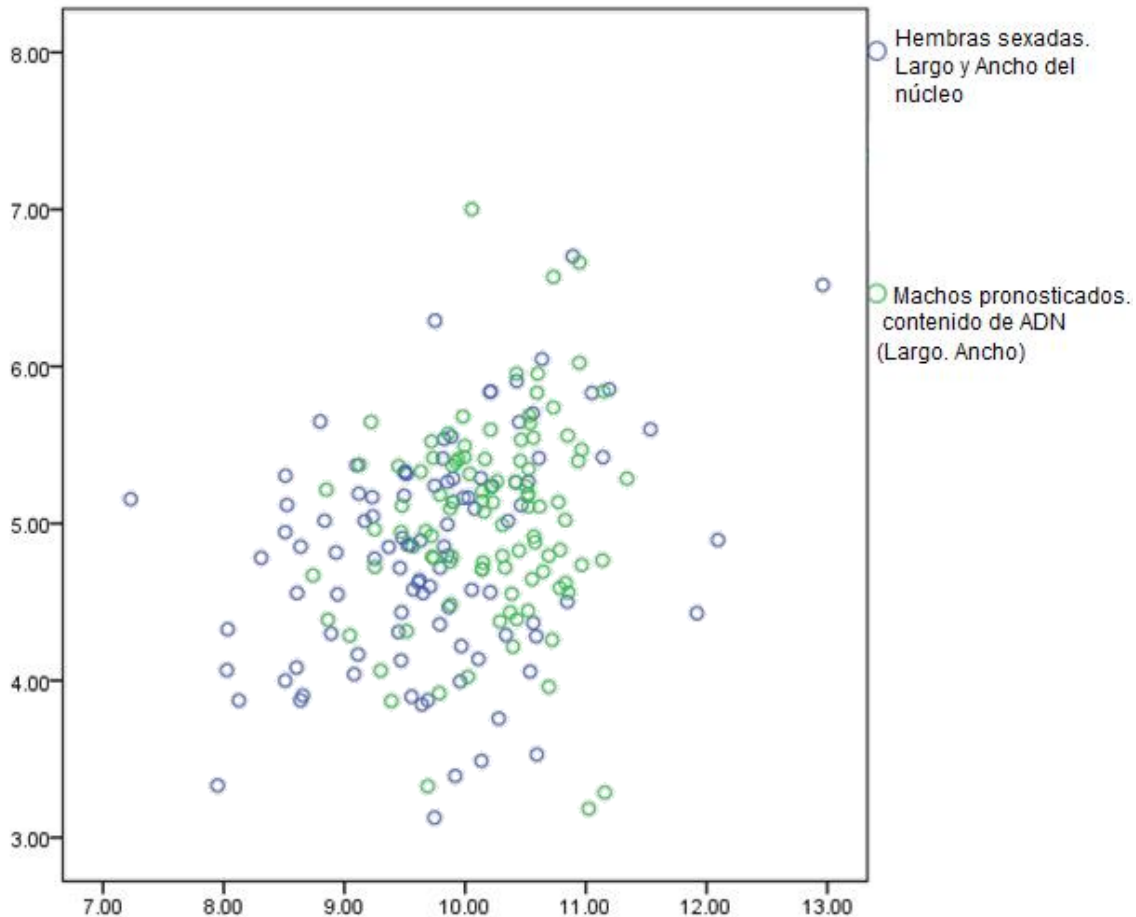


Figura 7. Comparación entre espermatozoides hembras sexadas por CF y espermatozoides pronosticados machos de las muestras sin sexar, basados en el largo y ancho de la cabeza espermática. 149 datos corresponden a los espermatozoides sexados, 102 datos corresponden a los espermatozoides pronosticados macho.

En las figuras 8 y 9, se muestran las comparaciones realizadas entre los espermatozoides pronosticados como machos y como hembras. Utilizando como criterio de separación el largo y ancho del núcleo y de la cabeza del espermatozoide. Nuevamente al

utilizar como criterio la cabeza espermática no es posible esclarecer efectivamente el sexo del espermatozoide; por otro lado, el contenido de ADN del núcleo muestra una separación clara entre dos subpoblaciones.

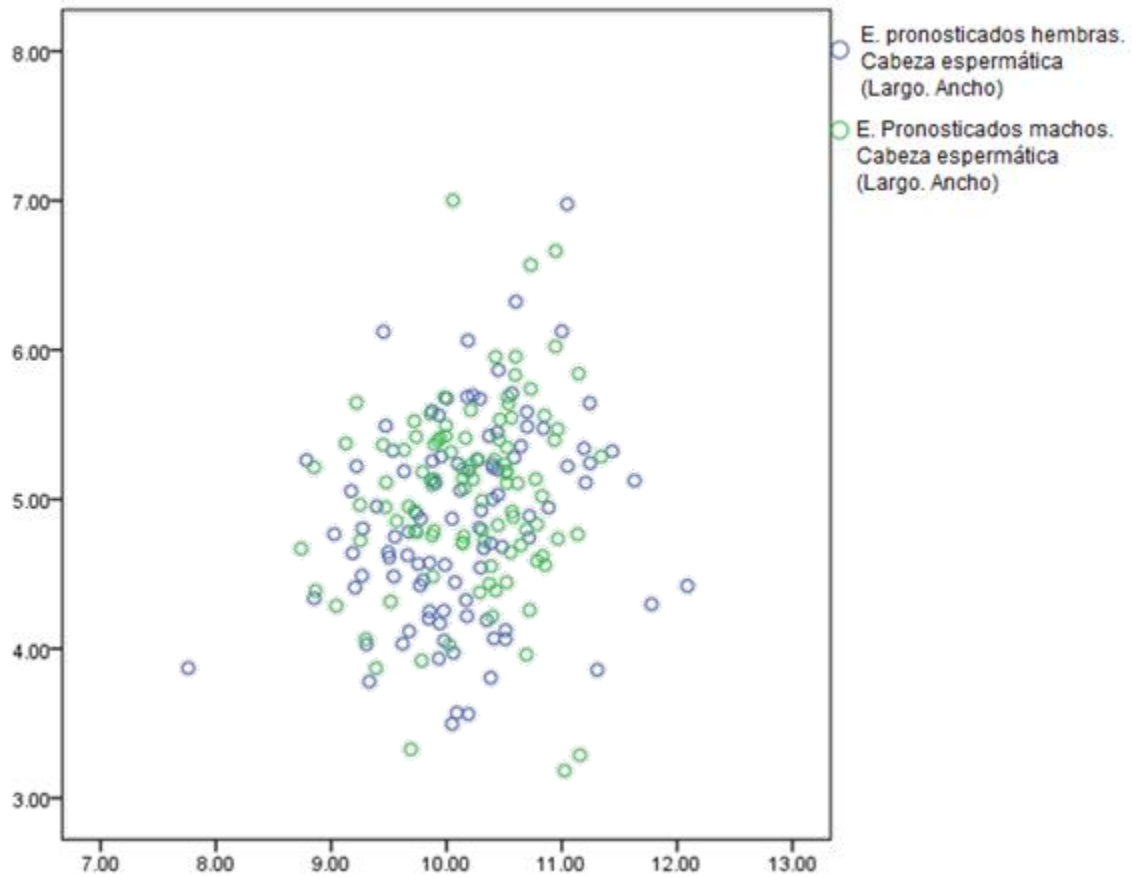


Figura 8. Comparación entre espermatozoides machos y hembras pronosticados de muestras no sexadas basado en el largo y ancho de la cabeza espermática. Los grupos formados se solapan, impidiendo la distinción de las subpoblaciones. 102 datos corresponden a la fracción pronosticada – Y, 108 datos corresponden a la fracción pronosticada –X.

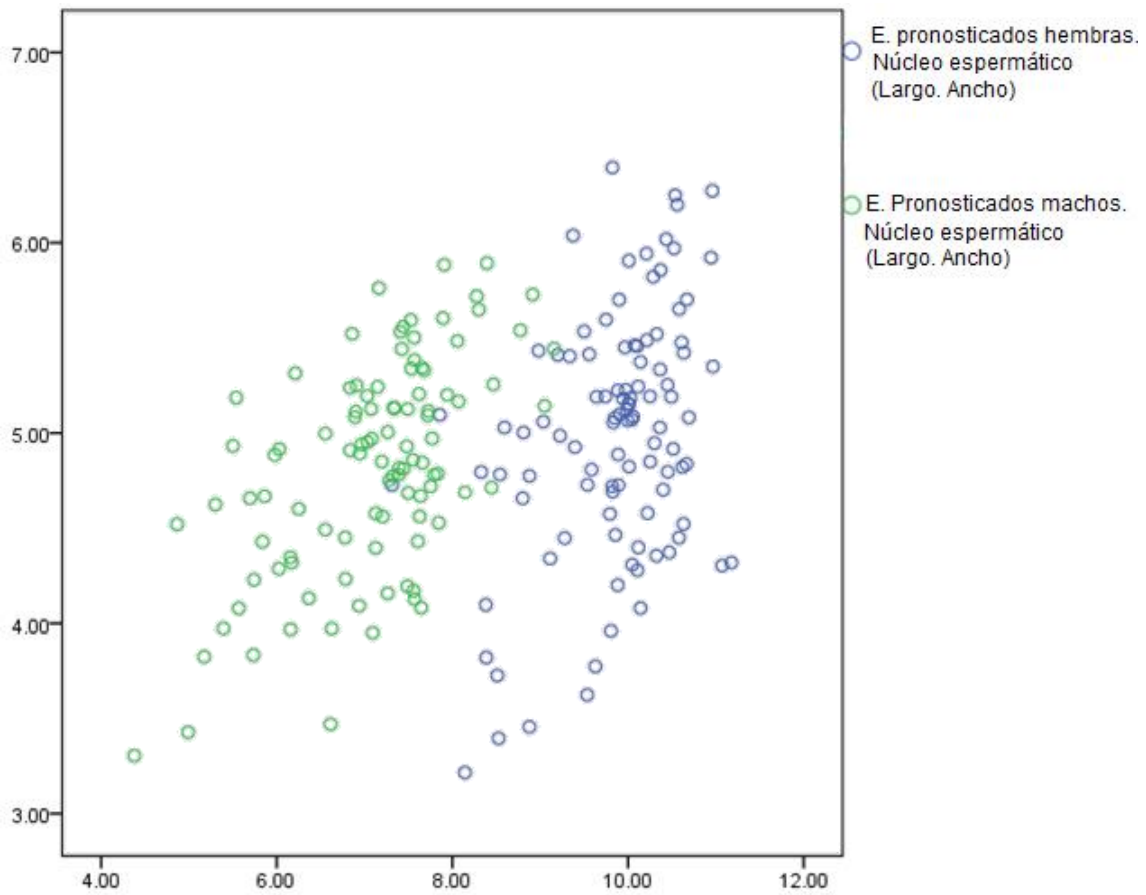


Figura 9. Comparación entre espermatozoides machos y hembras pronosticados de muestras no sexadas basado en el largo y ancho del núcleo. Se forman dos conglomerados definidos, permitiendo separar las subpoblaciones. 102 datos corresponden a la fracción pronosticada –Y, 108 datos corresponden a la fracción pronosticada –X.

DISCUSION

En la actualidad la sociedad ha entrado en discusión el tema de la selección del sexo por razones no médicas pero recientemente el Consejo de Europa informa sobre las consecuencias sociales más amplia en términos de un aumento de la criminalidad, el malestar social, violaciones de los derechos, como discriminación contra las mujeres (Consejo de Europa, 2011). Sin embargo, como ha mencionado la OMS, la disponibilidad de tecnologías de selección de sexo no debe ser considerado como la causa raíz de estos problemas (WHO, 2011). La causa principal es la preferencia cultural y económica integrado para el varón, por disminución de la fecundidad y el control de la población, con la facilitación de la tecnología (Guilmoto, 2009; Hvistendahl, 2011). Mientras que encuestas muestran constantemente que sólo una pequeña minoría de las parejas dicen que les gustaría hacer uso de la selección del sexo con el fin de tener una familia con niños de ambos sexos (Dahl et al., 2006). Dada la falta de una fuerte preferencia sexual, no hay ninguna razón para pensar que dará lugar a una distorsión de la proporción de sexos (Van Balen, 2006).

La selección del sexo por razones médicas es ampliamente considerada como aceptable ya que tiene por objeto evitar riesgos para la salud en lugar de proporcionar los futuros padres con un hijo de un sexo determinado. Como se reconoce en la Ley HFE británica, la selección de sexo no es "Médico" sólo

cuando el objetivo es evitar las enfermedades ligadas al sexo como la de distrofia muscular de Duchenne o hemofilia, sino también cuando el riesgo de transmitir una enfermedad no mendeliana con una incidencia del sexo desigual. A pesar de que en estos casos la selección de sexo no puede excluir el nacimiento de un niño con el trastorno relevante, se puede reducir el riesgo de un niño afectado. Pero de aquí surge la pregunta si es suficiente para justificar un procedimiento selectivo por sexo pero esto dependerá de la gravedad de la enfermedad y la cantidad de la reducción del riesgo, de las cargas y los costes relacionados con la el tipo de procedimiento (Pennings, 2002).

Mientras la selección del sexo está motivada por una preocupación por la salud no hay razón para cuestionar su aceptabilidad en principio (WHO, 2011).

Identificar el sexo en espermatozoides individuales es de particular interés para desarrollar un nuevo proceso de sexado, o para determinar el éxito de dicho proceso (Colley *et al.*, 2008)

El análisis de conglomerados de K medias nos permitió separar estadísticamente los espermatozoides en dos grupos (correspondientes al sexo de los espermatozoides) en muestras no sexadas, utilizando como criterio las diferencias en la cabeza espermática y en el núcleo; basados en la definición de los grupos de cada criterio, podemos discernir mejor entre las subpoblaciones

presentes en una muestra sin sexar utilizando las mediciones del contenido de ADN en núcleo celular teñido con DAPI al obtener grupos más heterogéneos en las mediciones, obteniendo 106 espermatozoides pronosticados portadores -X y 104 portadores -Y estadísticamente, lo cual coincide con el número de espermatozoides pronosticados con 108 y 102 espermatozoides portadores del cromosoma -X y -Y respectivamente. El número de espermatozoides presentes en cada conglomerado no varía de la relación teórica propuesta de 50:50, que es la relación de espermatozoides portadores del cromosoma -X y -Y en un eyaculado (Welch Y Johnson, 1999).

Cuando se comparan los diferentes tipos de muestras siendo el criterio las mediciones basadas en el núcleo celular observamos de manera consistente la formación de dos grupos diferentes bien definidos cuando se supone una comparación entre espermatozoides de diferente sexo, no existiendo una definición clara entre grupos al comparar espermatozoides -X sexados y -X pronosticados, formándose un grupo homogéneo (observable a través del solapamiento de los datos), esto debido a que el contenido ADN es una característica bien definida, constante e improbablemente alterable en los mamíferos (Garner, 2006).

Al correlacionar las dimensiones del núcleo de los espermatozoides con las medidas morfométricas de la cabeza en las diferentes muestras con el fin de

detectar las diferencias entre el contenido de ADN con el volumen de la cabeza de los espermatozoides, solamente el ancho del núcleo y el ancho de la cabeza de los espermatozoides muestra una correlación positiva significativa constante en cada muestra; además las variables del largo, tanto del núcleo como de la cabeza, no presentan distribuciones normales entre los diferentes tipos de muestra a pesar de contar con una cantidad suficiente de datos, esto puede deberse a varias razones, anomalías en los espermatozoides que afecten la cabeza, como la microcefalia y macrocefalia (asociados con una distribución desigual de los espermatozoides) cabezas piriformes (indica defecto de la espermatogénesis) (Tribulo *et al.*, 2012), defectos ocasionados durante el proceso de criopreservación (Barrientos *et al.*, 2009), a la forma irregular característica de los espermatozoides en un plano sagital, causando errores de medición en la técnica, ya que como afirma Garner (2006): “la efectividad de utilizar las diferencias en el contenido de ADN entre espermatozoides -X y -Y depende no solamente en las diferencias relativas del ADN, sino también en la habilidad de orientar precisamente los gametos al momento de tomar mediciones”. Aun cuando no es posible orientar los espermatozoides a la posición deseada por la falta del equipo como en este estudio, es posible tomar mediciones precisas, si se calcula el grosor óptico de los espermatozoides para ajustar las medidas (van Munster *et al.*, 1999).

Las diferencias en el tamaño de la cabeza espermática debidas a las diferencias en el contenido del ADN puede parecer extraña al considerar que solo el 20% de la cabeza del espermatozoide consiste en ADN, una posible explicación de porqué esta relación puede existir puede deberse a que el 80% restante consiste en proteínas y membranas cuya función principal es empaquetar y proteger el ADN; un mayor contenido de ADN por parte del espermatozoide X significaría a su vez, mayor cantidad de material de empaquetamiento (van Munster *et al.*, 1999). Al estudiar la posibilidad de desarrollar un proceso de sexado espermático morfológico uno de los principales factores limitantes es la inherente variación biológica intrapoblacional no relacionada al contenido de ADN (Johnson, 1994), la cual no puede ser controlada y es difícil de detectarse. Las variaciones que presentan los datos no solo son por causa biológica, también pueden deberse a las limitaciones y errores instrumentales.

La eficiencia del control del sexo recae en la pureza del semen sexado (Colley *et al.*, 2008; Garner (2006) refiriéndose al sexado por CF menciona que en ocasiones es necesario estandarizar el procedimiento para cada individuo, Cui (1997) encontró que en humanos el espermatozoide -X es más grande que el -Y, sin embargo el umbral entre estas diferencias varía con cada individuo; en este estudio, las muestras proporcionadas provienen de diferentes individuos, pudiendo ser una posible variable que no haya permitido detectar diferencias estadísticas en la cabeza espermática entre las diferentes muestras, mostrándose siempre como un mismo grupo homogéneo. Es por ello que en esta técnica se deben analizar las variables del núcleo y la cabeza espermática en conjunto para obtener mejores resultados; el análisis conjunto del núcleo y la cabeza espermática puede ser una herramienta de sexado exitosa al combinarse con ICSI.

CONCLUSION

En este estudio con la técnica utilizada fue posible detectar la fluorescencia diferencial entre las fracciones espermáticas -X y -Y en espermatozoides teñidos con DAPI. Sin embargo no fue posible detectar diferencias en el tamaño de la cabeza espermática.

Mediante el análisis estadístico de conglomerado de K medias fue posible diferenciar entre las dos subpoblaciones espermáticas en una muestra no sexada; los resultados muestras que al analizar el núcleo se obtienen resultados más confiables que al medir la cabeza espermática.

BIBLIOGRAFIA

Barrientos, M., Juárez, M.L., Trujillo, M.E., y Montiel, F. (2009). Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca perinuclear en semen criopreservado de verraco. *Zoot. Trop.* 27(1): 17-24.

Betancourt, M.; Fierro, R.; Ambriz, D. 1993. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology*. 40:1115-1160.

Bouvet R; Paparella C; Feldman R. (2007). Efecto del tabaquismo sobre la espermatogénesis en hombres con infertilidad idiopática. *Arch. Esp. Urol.* 60(3). ISSN 0004-0614.

Catt, J.W.; Rhodes, S. (1995). Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic animals. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:161-167.

Catt, J.W. (1996). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology. *Anim. Reprod. Sci.* 42:239-250.

Chen, S.H and Seidel, G, E. (1997). Effects of oocytes activation and treatment of spermatozoa on embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Theriogenology*. 48:1265-1273.

Choi, Y.H; Love, C.C; Love, L.B; Varner, D.D; Brinsko, S; Hinrichs, K. (2002). Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod.* 123:455-465.

Colley, A.; Buhr, M.; y Golovan, S.; (2008). Single bovine sperm sex typing by amelogenin nested PCR. *Theriogenology*, 70, 978-983. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.060>.

Council of Europe, Parliamentary Assembly. Resolution 1829: sex selection, 2011 <http://assembly.coe.int/Main.asp?link=/Documents/AdoptedText/ta11/ERES1829.htm> (3 March 2013, date last accessed).

Cui, K.H. (1997). Size differences between human X and Y spermatozoa and pre-fertilization diagnosis. *Mol Hum Reprod* 3: 61-67.

Dahl E, Beutel M, Brosig B, Grüssner S, Stoßel-Richter Y, Tinneberg HR, Brähler E. Social sex selection and the balance of the sexes: empirical evidence from Germany, the UK, and the US. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:311 – 318.

De Geyter C, Sterthaus O, Miny P, Wenzel F, Lapaire O, De Geyter M, Sartorius G. (2013). First successful pregnancy in Switzerland after prospective sex determination of the embryo through the separation of X-chromosome bearing spermatozoa. *Swiss Med Wkly*; 143:w13718.

Estrada, E; Uribe, M. (2002) Atlas de histología de vertebrados. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 227p.

Fugger, E.F., Black, S.H., Keyvanfar, K., Schulman, J.D., 1998. Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intra-uterine insemination, in vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 13 _9., 2367–2370.

Gajda, B. (2009). Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. *Reprod. Biol.* 9 (2):97-112.

García-Roselló; Matás, C.; Cánovas, S.; Moreira, P.N.; Gardea, J.; Coy, P. (2006). Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *J. Androl.* 27:268-275.

Garner, D.L., Gledhill, B.L., Pinkel, D., Lake, S., Stephenson, D., Van Dilla, M.A. y Johnson, L.A. (1983). Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 28 312–321. (doi:10.1095/biolreprod28.2.312).

Garner, D. L., y Seidel, G. E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69 (7), 886–895.
<http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.006>

Garner DL. Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology* 2009; 71:11–21.

Gilbert, S. (2005). *Biología del desarrollo*. 7ma edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 889p.

Gledhill, B.L., Lake, S., Steinmetz, L.L., Gray, J.W., Crawford, J.R., Dean, P.N., Van Dilla, M.A., (1976). Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. *J. Cell. Physiol.* 87, 367–376.

Gómez J. (2005). Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopía electrónica de barrido (SEM). *Revista latinoamericana de fertilidad*. 22 (1). P.58-66.

Gómez, M.C.; Catt, J.W.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (1997). Effect of culture, incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:665-673.

Gómez, M.C.; Catt, J.W.; Evans, G.; Maxwell, M.C. (1998). Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod. Fertil. Dev.* 10:197-205.

González, J.; Lailla, J.; Fabre, E.; González, E. (2006) *Obstetricia*. 5ta edición. MASSON. Barcelona, España. 879p.

Goto, K.; Kinoshita, A.; Takuma, Y.; Ogawa, K. (1990). Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized killed spermatozoa. *Vet. Rec.* 127:517-520.

Guerino, G.; Filho, M.; Vasconcellos-Sala, R., y Ferreira-Mendanha, M. (2013). Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed. *InTech*, 39–61. <http://doi.org/10.5772/45731>.

Guilmoto CZ. The sex ratio transition in Asia. *Popul Dev Rev* 2009; 35:519 – 549

Haigo, K; Yamauchi, Y; Yazama, F; Yanagimachi, R; Horiuchi, T. (2004). Full-term development of hamster embryos produced by injection of round spermatids into oocytes. *Biol.Reprod.* 71:194-198.

Horiuchi, T.(2006).Application study of intracytoplasmic sperm injection for golden hamster and cattle production. *J.Reprod.Dev.* 52:13-21.

Hosoi, Y; Iritani, A. (1993). Rabbit microfertilisation. *Mol.Reprod.Dev.* 36:28 2-284.

Hvistendahl M. Unnatural Selection. Choosing Boys over Girls, and the Consequences of a World Full of Men. New York: Public affairs, 2011.

Johnson, L.A., 1992. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *J. Anim. Sci.* 70 _ Suppl. 2., 8–18.

Johnson, L.A., Welch, G.R., Keyvanfar, K., Dorfmann, A., Fugger, E.F., Schulman, J.D., 1993. Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X- and Y- spermatozoa for the prevention of X-linked diseases. *Human Reprod.* 8 _10., 1733–1739.

Johnson, L.A., Welch, G.R., Rens, W., 1999. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sorting gives improved sperm output for IVF and AI. *J. Anim. Sci.* 77 _Suppl. 2., 213–220.

Johnson, L.A., Guthrie, H.D., Fiser, P., Maxwell, W.M.C., Welch, G.R., Garrett, W.M., 2000. Cryopreservation of flow cytometrically sorted boar sperm: effects on in vivo embryo development. *J. Anim. Sci.* 78 _Suppl. 1., Abstr., in press.

Johnson, L. A.; Cran, D. G.; y Polge, C. (1994). Recent advances in sex preselection of cattle: Flow cytometric sorting of X- & Y-chromosome bearing sperm based on dna to produce progeny. *Theriogenology*, 41, 51–56.

Johnson, L.A., Flook, J.P., Look, M.V., 1987. Flow cytometry of X- and Y-chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res.* 17, 203–212.

Karabinus DS.(2009). Flow cytometric sorting of human sperm: MicroSort clinical trial update. *Theriogenology*; 71:74 – 79.

Katayama, M; Koshida, M; Miyake, M. (200 2). Fate of the acrosome in ooplasm in pigs after IVF and ICSI. *Hum.Reprod.* 17:2657-2664.

Keskintepe, L; Brackett, B.G.(2000). Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology.* 53:1041-1052.

Kimura, Y;
Yanagimachi,R.(1995).Intracytoplasmic sperm injection in the mouse.Biol.Reprod.52:709-720.

Kolbe, T; Holtz,W.(2000).Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI).Anim.Reprod.Sci.64:97-101.

Kwon,I.K; Park,K.E;
Niwa,K.(2004).Activation pronuclear formation and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa.Biol.Reprod.71:1430-1436.

Kyung-Bon, L; Koji, N.(2006). Fertilization and development in vitro of bovine oocytes following intracytoplasmic injection of head-dried sperm heads. Biol.Reprod.74:146-152.

Lee,J.W; Tian, X.C; Yang, X.(2003).Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic injection. Biol.Reprod.68:1341-1347.

Lee.J.W; Niwa,K.(2006).Fertilization and development in vitro of bovine oocytes following intracytoplasmic injection of head-dried sperm heads. Biol.Reprod.74:146-152.

Martin,M.J.(2000).Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection.Biol.Reprod.63:109-112.

Moruzzi, J.F.,(1979). Selecting a mammalian species for the separation of X-

and Y-chromosome-bearing spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 57, 319–323.

Nakai,M; Kashiwazaki,N; Takizawa, A;Maedomari,N; Ozawa, M; Noguchi,J; Kaneko, H; Shino, M; Kikuchi,K.(2007).Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. Zygote.15:15-24.

Oguna, A; Ogunuki, N; Inoue, K; Mochida, K.(2003).New microinsemination techniques for laboratory animals. Theriogenology.59:87-94.

Oikawa, T; Takada, N; Kikuchi,T;Numabe, T;Takenaka,M; Horiuchi,T. (2005).Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. Anim. Reprod.Sci.86:187-194.

Palermo,G; Hubert, J; Devroey,P; Van Steirteghem,A.(1992).Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet.340:17-18.

Patricio,P;
Tucker,M.J.;Guelman,V.(2003).Atlas de reproducción asistida. Ed.Mc Graw Hill. México, Distrito Federal.pp.81

Pennings G. Personal desires of patients and social obligations of geneticists: applying preimplantation genetic diagnosis for non-medical sex selection. Prenat Diagn 2002;22: 1123 – 1129.

Pinkel, D., Gledhill, B.L., Van Dilla, M.A., Stephenson, D., Watchmaker, G., (1982). High resolution DNA measurements of mammalian sperm. *Cytometry* 3, 1–9.

Prasad, S.; Rangasamy, S.; Y Satheskumar, S. (2010). Sex Preselection in Domestic Animals - Current status and Future prospects, *3(7)*, 346–348.

Pope, C.E.; Johnston, C.A.; McRae, M.; Keller, G.L. (1998). Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim.Reprod.Sci.* 53:221-236.

Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreier, L.L., Johnson, L.A., 1999. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce piglets after embryo transfer. *J. Anim. Sci.* 77, 3346–3352.

Rath, D., Barcikowski, S., Graaf, S. De, Garrels, W., Grossfeld, R., Klein, S., y Washausen, S. (2013). Sex selection of sperm in farm animals: Status report and developmental prospects. *Reproduction*, 145(1). <http://doi.org/10.1530/REP-12-0151>.

Rho, G.J.; Kawarsky, S.; Johnson, W.H.; Kochlar, K.; Betteridge, K.J. (1998). Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection bovine oocytes. *Biol.Reprod.* 59:918-924.

Santamaría, E. (2013) Entender y combatir la progresión de la distrofia muscular de Duchenne en modelos animales. Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España.

Seidel, G.E. Jr., Schenk, J.L., Herickoff, L.A., Doyle, S.P., Brink, Z., Green, R.D., Cran, D.G., 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52, 1407–1420.

Seidel, G. E. (2007). Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, 68(3), 443–446. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.005>.

Sharpe, J. C., y Evans, K. M. (2009). Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*, 71, 4–10. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.021>.

Shenfield F, Pennings G, Devroey P, Sureau C, Tarlatzis B, Cohen J. (2003).ESHRE Ethics Task Force. Taskforce 5: preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 18:649–651.

Shirazi, A; Ostad-Hosseini, S; Ahmadi, E; Heidari, B; Shams-Esfandabadi, N. (2009). In vitro developmental competence of ICSI-derived activated ovine embryos. *Theriogenology*. 71:342-348.

Strasinger, S; Schaub, M. (2010). Análisis de orina y líquidos corporales. 5ta edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 301p.

Squires,E.L; Wilson,J.M; Kato,H;Blaszczyk,A.(1996).A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*.45:306.

Urbina M; Lerner J.(2008).Fertilidad y reproducción asistida, Editorial Médica Panamericana.Caracas,Venezuela.625p.

Universidad de Navarra (2012) Enfermedades ligadas al sexo. Facultades de ciencias. Departamento de ciencias .Madrid, España.

Van Balen F. Attitudes towards sex selection in the Western world. *Prenat Diagn* 2006;26:614 – 618.

Van Munster, E. B., Stap, J., Hoebe, R. Te Meerman, G. J., y Aten, J. (1999). Difference in volume of X- and Y-chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content. *Cytometry*, 35, 125–128.[http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19990201\)35:2<125::AID-CYTO3>3.0.CO;2-H](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19990201)35:2<125::AID-CYTO3>3.0.CO;2-H)

Vázquez, C; Martin, A; Siloniz, I; Serrano, S (2010) Técnicas básicas de Microbiología observación de bacterias. Universidad Complutense, Madrid, España.

Wang, B; Baldessare,H; Pierson, J; Cote, F; Rao,K.M; Karatzas,C.N. (2003).The in vitro and in vivo development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa. *Zigote*.11:219-227.

Wani,N.A.(2002).In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes, *Small Rum.Res*.44:89-95.

Welch, G. R., y Johnson, L. (1999). Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology*, 52(8), 1343–1352. [http://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00221-6](http://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00221-6).

WHO. Preventing gender-biased sex selection. Geneva: World Health Organization,2011.http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501460_eng.pdf (3 March 2013, date last accessed).

Yamauchi, Y; Yanagimachi, R; Horiuchi, T.(2002).Full term development of golden hámster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection.*Biol. Reprod*.67:534-539.