

27  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

FALLA DEL GEN

METODOS PARA LA SELECCION PRECONCEPCIONAL  
O EMBRIONARIA DEL SEXO DE LA DESCENDENCIA  
(revisión bibliográfica)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

FELIPE DE JESUS ESPINOSA BECERRA

ASESOR: M.V.Z. M.C. JOSE DE LUCAS TRON



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1991



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

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

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

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

INDICE	PAG
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE CUADROS	X
OBJETIVOS	XI
I. INTRODUCCION	1
II. METODOS SELECTIVOS DE CONCEPCION	5
2.1 Introducci3n	6
- Caracteristicas del dise1o experimental.	6
2.2 Momento Optimo de la Fertilizaci3n (influencias hormonales).	8
- Estudio del fen3meno en el humano	8
- Estudio del fen3meno en otras especies	9
- Evidencias empiricas (relaciones casuales) y evidencias hormonales (etiol3gicas) del momento de la c3pula y la proporci3n sexual al nacimiento (psn)	10
2.3 Tratamientos Vaginales	13
- Soluciones Acidas o alcalinas (aspectos bioquimicos)	13
. Factores que afectan la motilidad espermatica	13
- Diferencias entre la mortalidad prenatal entre sexos y diferencias entre la proporci3n sexual (ps) primaria y la ps secundaria	15
- Soluci3n vaginal a base de suero anti H-Y	15
2.4 Efectos Dados por la Alimentaci3n	16
- Relaci3n potasio sodio/calcio magnesio.	16
. Gliceril forforilcolina diesterasa (GPC diesterasa, relaci3n Na+K+/Ca++Mg++ y su influencia sobre la psn	17
. Limitantes en la suplementaci3n de minerales	18
- Restricci3n de la alimentaci3n	19
III. METODOS PARA SEXAR EL ESPERMA	21
3.1 Introducci3n	22
- Consideraciones econ3micas en la experimentaci3n y en la practica	23

- Parámetros en inseminación artificial con semen no sexado	23
- Clasificación de los métodos para sexar el semen	24
3.2 Selección de Espermatozoides Mediante la Identificación de Características Diferenciales de Superficie	25
- Separación inmunológica de espermatozoides (detección del antígeno H-Y)	25
- Electroforesis de flujo libre (detección de cargas de superficie)	28
3.3 Selección de Espermatozoides Mediante la Identificación de Características Diferenciales Internas	30
- Separación en gradientes de albúmina	30
. Tinción de quinacrina, ?específica para cromosoma Y	32
- Cromatografía en columna de sefadex	33
- Centrifugación en gradientes de densidad de Percoll	34
. Técnica	35
- Citometría y separación de flujo.	36
<b>IV. METODOS PARA SEXAR EMBRIONES</b>	<b>39</b>
4.1 Introducción	40
- Generalidades sobre anatomía y fisiología del embrión	40
- Transferencia embrionaria y técnicas complementarias	42
. Técnicas complementarias en la transferencia embrionaria	44
4.2 Enzimas Ligadas al Cromosoma X	46
. Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HPRT)	47
. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD)	48
. Alfa galactosidasa (alfa-gal)	49
4.3 Sexaje Embrionario Mediante Técnicas Inmunológicas (detección del antígeno H-Y)	50
- ¿Qué es el antígeno H-Y y cuál es su función?	50
- Detección del antígeno H-Y en embriones	51
. Técnicas citotóxicas	52
. Técnicas de inmunofluorescencia indirecta	52
. Relación entre velocidad de crecimiento y cultivo en suero anti H-Y, con el sexo del embrión	54
- Producción de suero hiperinmune H-Y	54
. Trasplante repetido de tejidos	54
. Inmunización con células de macho	55

- Problemas en la producción de antisuero	55
- Evaluación de la especificidad del antisuero para detectar el antígeno macho (H-Y)	58
4.4 Sexaje Embrionario Mediante Análisis Cromosómico o Citogenético (cariotipo)	61
- Cariotipo como medio para sexar embriones	61
- Premisas y pasos para la realización de un cariotipo	61
- Variables embrionarias en el sexado por cariotipo	63
4.5 Sexaje Embrionario Mediante Hibridización del DNA (sondas Y específicas)	66
- Orígenes del sexado embrionario mediante hibridización del DNA	67
- Utilidad de las secuencias (únicas y repetitivas) en la hibridización del DNA con fines de diagnóstico sexual	68
- Polimerasa de reacción en cadena	69
<b>V. POSIBILIDADES FUTURAS PARA INFLUIR EN LA PROPORCIÓN SEXUAL DE LA DESCENDENCIA</b>	<b>72</b>
5.1 Introducción	73
5.2 Selección de Sementales para la PSN	74
5.3 Disrupción de Puentes Citoplasmáticos Durante la Espermatogénesis	75
- Estructura de los puentes citoplasmáticos	76
- Función de los puentes citoplasmáticos	76
- Hipótesis	77
5.4 Distorsión en la Proporción de Transmisión	77
- Hipótesis	78
5.5 Reversión Sexual	79
- Reversión sexual inducida humoralmente	81
- Hipótesis	81
- Diferenciación sexual	81
- Diferenciación gonadal	81
- El proceso de la diferenciación sexual visto desde otros ángulos	83
- Activación de la diferenciación sexual en tejidos extragonadales	83
- Tasas de desarrollo embrionario y dimorfismo sexual	84
- Conclusión	84
5.6 Animales Transgénicos	85
- Control de la expresión genica	85
- Producción de animales transgénicos	86

. Características, utilidad y medios para transferir los transgenes	86
- Reversión sexual inducida genéticamente	87
. Producción del transgene inductor de la reversión sexual (hipótesis)	87
. Cuál es y dónde se localiza el gene activador de la diferenciación sexual (gads)	88
- Conclusión	90

## APENDICE

<b>MÉTODOS COMPLEMENTARIOS</b>	<b>91</b>
A.1 Cariotipo (técnicas de bandeado cromosómico)	92
. Técnicas de bandeado	93
- Metodología	95
. Cultivo celular	95
. Arrestadores del huso mitótico	95
. Tratamiento hipotónico	96
. Fijación	96
. Tinción	96
A.2 Citometría de Flujo y Separación Celular	97
- Metodología	99
. Preparación celular	99
. Tinción	99
. Especificaciones del aparato	100
- Separación de cromosomas mediante citometría y separación de flujo	100
A.3 Tecnología del DNA Recombinante (hibridización del DNA)	101
- Enzimas o Endonucleasas de Restricción	102
- Clonación del DNA	103
. Plásmido	104
. DNA complementario (DNAC)	105
. Polimerasa de reacción en cadena (PCR)	105
- Hibridización del DNA	108
. Transferencia Southern	108
. Hibridización	110

## BIBLIOGRAFIA

112

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAG
1. Relación entre el momento de la ovulación y fertilización con la psn.	9
2. Niveles hormonales de LH y estradiol, y su relación con la psn de la progenie.	11
3. Actividad de la GPC-diesterasa uterina, relación sodio-potasio/calcio magnesio de la dieta, y psn.	17
4. Migración diferencial de espermatozoides X e Y en un campo eléctrico.	29
5. Citómetro y Separador de Flujo.	38
6. Diferentes etapas embrionarias y su número celular.	42
7. Técnica de transferencia embrionaria no quirúrgica.	43
8. Seccionamiento embrionario.	44
9. Medición de la actividad de la HPRT en embriones de ratón de diferentes edades.	47
10. Respuesta inmune contra el antígeno H-Y en hembras inmunizadas con células singénicas de bazo.	56
11. Anticuerpos producidos por hembras en respuesta a la inmunización con células esplénicas de macho o a la entrada de un antígeno exógeno y, efectos del antisuero H-Y durante el sexado embrionario.	57
12. Comunicación entre las células mediante puentes citoplasmáticos a lo largo de la espermatogénesis.	75
13. Clasificación de los cromosomas según la localización del centrómero.	93
14. Diferencias en el número de bandas que presentan los cromosomas de humano con dos técnicas de bandeado G.	94
15. Esquema de la técnica de bandeado G.	97
16. Citómetro de Flujo.	98
17. Tubo de inyección del citómetro de flujo.	100
18. Histograma en forma de curvas Gaussianas que representan la fluorescencia emitida por los núcleos espermáticos.	100

19. Secuencia de bases alrededor del sitio de corte y tipo de corte del DNA con diferentes endonucleasas de restricción.	102
20. Secuenciación de bases en FRLVs mediante electroforesis posteriormente a haberlos sometido a tratamientos químicos específicos.	103
21. Inserción de DNA heterogeneo al DNA del plásmido.	104
22. Replicación del DNA en forma natural.	106
23. Replicación (clonación) del DNA por la técnica de PCR.	107
24. Transferencia de FRLVs a papel filtro por la técnica de Southern.	109
25. Hibridización del DNA post-transferencia Southern.	110



## INDICE DE CUADROS

CUADROS	PAG
I Número de muestras requeridas para detectar una alteración significativa de la proporción sexual entre el grupo control y el grupo experimental.	7
II Anatomía del embrión (preimplantación) en diferentes especies.	41
III El antígeno H-Y en el sexado de embriones de ratón.	53
IV Absorción de antisuero H-Y.	58
V Características morfológicas de los cromosomas sexuales en diferentes especies domésticas.	62
VI Índices mitóticos en embriones (en etapa de mórula) de las especies bóvida, lepórida y murina.	64
VII Sexado e índice de preñez subsecuente en cuatro métodos de sexado embrionario.	71

## OBJETIVOS

El objetivo primario del presente trabajo, fué el de aportar literatura en idioma español, que de a conocer aquellos métodos creados con el fin de seleccionar el sexo de la descendencia durante cualquier etapa previa a la implantación del embrión, desde la gametogénesis hasta poco después de la fertilización del ovocito.

El segundo objetivo fué el de proporcionar a los técnicos e investigadores un material actualizado sobre el tema, indicando las líneas que se están explorando.

**CAPITULO I**

**I N T R O D U C C I O N**

## I INTRODUCCION

La mayor parte de estudios que pretenden hacer variar las proporciones naturales de los sexos (al menos en lo que se refiere a los métodos preconceptionales) se han y se están realizando encaminados a resolver problemas en la reproducción humana. Las razones por las que el hombre ha querido influir en la proporción sexual de su descendencia han sido muy diversas. Desde las puramente sociales y culturales (aquellas parejas que han concebido varios hijos de solamente alguno de los sexos y quisieran tener "por lo menos uno" del otro sexo) a las que se conciben en base a un razonamiento más trascendente (familias relacionadas con padecimientos ligados al sexo, v.gr. hemofilia) (Gledhill, 1988; Labro y Papa, 1984; Amann, 1989).

La selección del sexo de la descendencia ha estado en la mente del hombre a través de su historia. Ya en el siglo V a.c. los filósofos griegos pensaban que los varones se desarrollaban en la parte derecha del útero y las mujeres en la izquierda. Por ello recomendaban que, durante el acto sexual, la futura madre se recostara del lado correspondiente al sexo deseado para el ser a engendrar (Gledhill, 1988; Labro y Papa, 1984). Entre los espartacos era común el infanticidio femenino; en la actualidad, análogo a este tenemos la práctica, aún muy común dentro de las explotaciones lecheras, de sacrificar a la mayoría de terneros machos poco después de nacidos. En el siglo XVIII, se pensaba que la mayor parte de la descendencia masculina se engendraba por influencia del testículo derecho y, el izquierdo, influía sobre una mayor descendencia del sexo femenino. Inclusive, llegó a ser práctica común la remoción del testículo "relacionado mayormente" con el sexo menos deseado para los hijos. Aún en época reciente (1971), Dawson (citado por Gledhill, 1988) afirmaba que el sexo de los niños está determinado por el origen del ovocito (ovulación del ovario derecho o del izquierdo para niños o niñas respectivamente). Es curiosa la relación existente entre el lado (derecho o izquierdo) y el sexo sobre el que se ha pensado que influye y seguramente se debe al predominio del patriarcado en la mayoría de las culturas y a que la palabra derecho (a) ha sido relacionada, ancestralmente, con lo correcto y la izquierda con aspectos negativos. Para ello basta con recordar algunos sinónimos y sus diferentes significados: derecho = recto (legal, correcto, altos principios morales), diestro (hábil), masculino; izquierda = siniestra (malevolencia), torcida, femenino... (Sagan, 1985).

Hace unos 30 años, estudios realizados en humanos y ratones establecieron el rol crítico del cromosoma Y en la determinación sexual en los mamíferos (Amann, 1989). Es por esto que se ha intentado separar los espermatozoides en dos poblaciones, una que porte el cromosoma sexual X y otra que porte el cromosoma Y.

Algunos métodos aseguran haber logrado un 80% o más de éxito en la separación (Ericsson, 1973; Johnson et al., 1989; Pinkel et al., 1982). Por desgracia ninguno de los métodos han sido lo suficientemente convincentes como para gozar de plena aceptación.

Afortunadamente, el panorama del "sexado" durante la etapa embrionaria es mucho más alentador (van Vliet et al., 1989). Los métodos creados con este fin se basan en diferencias antigénicas entre embriones "machos o hembras" (Anderson, 1987; Booman, 1988; Wachtel, 1984), diferencias metabólicas detectables (Epstein et al., 1972, 1978; Monk y Handyside, 1988; Williams, 1986) y el análisis cromosómico (Pinkel et al., 1985; Singh y Hare, 1980; Yoshizawa et al., 1989a,b).

Las técnicas de sexado embrionario dan resultados favorables más fácilmente repetibles que las utilizadas para el sexado del esperma, pero en general son laboriosas ya que primero se superovulan las vacas donadoras sincronizándolas con las receptoras, después habría que recolectar a los embriones, sexarlos y, por último, hacer la transferencia embrionaria. Sería, tal vez, más sencillo preparar semen sexado y utilizarlo en inseminación artificial.

En el campo de la veterinaria, una técnica efectiva para controlar el sexo de la progenie, podría ayudar a reducir el número de hembras necesaria para producir el número requerido de progenie del sexo deseado. Por ejemplo, en la industria lechera sería de gran utilidad poder inseminar un número de hembras apenas superior al porcentaje de reemplazos requeridos normalmente (20-35% correspondiente al desecho anual); esto sería un 30-45% de vacas inseminadas con semen enriquecido en espermatozoides portadores del cromosoma X. Así, el restante de los vientres podría ser inseminado con semen proveniente de razas especializadas en producción de carne y enriquecido en espermatozoides Y con lo que la progenie, en su mayoría masculina, tendría mejor comportamiento productivo que aquellos novillos cuya cualidad genética favorece la producción láctea principalmente. También en el ganado bovino permitiría reducir al máximo la incidencia de intersexos (freemartinismo; Hafez, 1989; Garner et al., 1983; Mohri et al., 1986). La selección del sexo de la progenie sería muy útil en explotaciones de reciente creación en las que el número de vientres sea menor al ideal ya que se podrían producir más hembras para reemplazo.

En el presente trabajo, además de los métodos sobre el sexado espermático y sobre el sexado embrionario, se exponen temas sobre métodos selectivos de concepción (v. gr. momento óptimo de la fertilización) y, por último, se plantean hipótesis recientes en cuanto a otros caminos para influir sobre las proporciones sexuales de la progenie, pero en los que aún no se ha hecho investigación abundante. Entre ellos, la interrupción de puentes citoplasmáticos y su relación con la expresión génica durante la espermatogénesis y, la producción de animales transgénicos con reversión sexual.

Para la mejor comprensión de los capítulos se hicieron aclaraciones pertinentes relacionadas con los temas a tratar como: cual es la proporción sexual natural en diferentes especies, parámetros en las técnicas de inseminación artificial y trasplante embrionario y otros, dejando una visión más amplia sobre el valor real de las técnicas .

## CAPITULO II

### METODOS SELECTIVOS DE CONCEPCION

## II METODOS SELECTIVOS DE CONCEPCION

### 2.1 INTRODUCCION

Este capítulo trata sobre estudios que se han llevado a cabo principalmente en humanos. Todos ellos se caracterizan por estar basados en la asociación (mediante el análisis estadístico) de fenómenos aparentemente poco relacionados. Los autores citados, dan algunas explicaciones a nivel fisiológico y, ocasionalmente, a nivel molecular.

Se deben hacer algunas acotaciones en cuanto a la nomenclatura a utilizar: las siglas **ps** significan proporción sexual y **psn** proporción sexual al nacimiento. Si después de las siglas **ps** o **psn** se señala una fracción sin mencionarse el sexo al que corresponda, se está haciendo referencia al sexo masculino. Es decir, si la **ps** a la concepción fuera de 0.61 indicaría que el 61% de los huevos fertilizados se desarrolla como embriones machos (XY). En el argot científico se mencionan dos tipos de tasas o proporciones sexuales, la primaria y la secundaria. La **ps** primaria corresponde a la de concepción (**ps** al momento de fertilización; Yoshizawa, 1989a) y la **ps** secundaria corresponde a la **psn** (Meckie y Drickamer, 1986; Mitra y Chowdhury, 1989).

Aunque frecuentemente se infiere que la **psn** es 50:50, es bien sabido que ésta es un poco diferente y dependerá de muchos factores: especie animal, características individuales, material biológico estudiado (espermatozoides, embriones, crios al nacimiento, etc.). Por ello, es poco conveniente utilizar la **ps** teórica siendo mejor evaluar material biológico control del mismo origen y contemporáneo al tratado (Amann, 1989; Moore y Gledhill, 1988). En humanos la **psn** es aproximadamente de 0.515 en razas caucásicas (Moore y Gledhill, 1988; James, 1987a). En bovinos, Powell et al. (1975), reportan que en la raza Holstein la **psn** es de 0.529; en este estudio la **psn** de la descendencia de varios toros varió de 0.387 a 0.644. En caso de utilizar la proporción teórica de 50:50 el número requerido de observaciones se incrementa en mucho como a continuación se señala (Moore y Gledhill, 1988).

**Características del diseño experimental (punto de vista estadístico).** Una parte importantísima de cualquier diseño experimental es la comprobación estadística. Por ello, se hacen algunas reflexiones a este respecto antes de comenzar a hablar sobre los métodos de selección sexual. Moore y Gledhill (1988), proponen las características que debe tener el análisis estadístico si se desea comprobar fehacientemente la alteración o no de la proporción sexual por alguno de los métodos ideados con este fin.



En todo experimento cabe esperar dos tipos de error al interpretar los resultados: el error tipo I, en el cual se cree haber logrado alterar la ps con el método utilizado sin que hubiera tal; y el error tipo II, en el que se reporta fracaso siendo que si es alterada la ps. La mayoría de pruebas estadísticas confieren un nivel de significancia de 0.05 para los errores tipo I y de 0.90 para los errores tipo II. Esto quiere decir que se esperaría cometer en promedio un error tipo I en 20 observaciones y un error tipo II por cada 10 observaciones (Moore y Gledhill, 1988).

Siempre que se quiera evaluar un método para controlar la psn de la progenie, el número de observaciones necesarias estará dado por la ps obtenida con ese método. Por ejemplo, si se obtiene una ps de 80:20 basado en 25 observaciones, para obtener un 95% de confianza, se diría que la ps real es igual o >63:37 quedando sólo un 5% de probabilidades de que fuera <63:37 (Amann, 1989). El número de observaciones debe aumentar entre más se asemeje la ps del grupo experimental a la del grupo control. Por ejemplo, si en el grupo control detectamos una ps de 55:45 y en el experimental es de 75:25 el número de observaciones requeridas es de 106, pero si en el grupo experimental la ps fue de 60:40 se necesitan de 1748 observaciones (Moore y Gledhill, 1988). En el cuadro I, se presenta el número de observaciones requeridas según las ps detectadas en el grupo experimental y el control.

Cuadro I. Número de muestras requeridas para detectar una alteración significativa en la proporción sexual entre grupos control y experimental hipotéticos.

PS grupo experimental	Proporción sexual del grupo control				
	40/60	45/55	50/50	55/45	60/40
45/55	1713				
55/45	202	447	1748		
65/35	75	114	198	430	1645
75/25	38	51	71	106	179
85/15	23	28	35	45	61
95/05	14	17	20	23	28

Modificado de Moore y Gledhill (1988).

Del análisis del cuadro anterior se infiere que entre mayor sea la "pureza" en el enriquecimiento de cualquiera de las 2 poblaciones, el número de observaciones requeridas es mucho menor.

Si se toma en cuenta que en la investigación sobre estos métodos difícilmente se puede obtener un "éxito" menor al 50%, nunca estará de más insistir en la importancia e indispensabilidad un análisis estadístico "exigente" como parte del diseño experimental.

## II.2 MOMENTO OPTIMO DE LA FERTILIZACION (influencias hormonales)

### Estudio del fenómeno en el humano

**Ovulación.** Muchos ginecólogos manejan que el momento de la relación sexual puede tener cierta influencia sobre el sexo del nuevo ser; para ser más precisos, se refieren al momento de la relación sexual con respecto a la ovulación de la mujer. Existe gran controversia en cuanto a que sexo se ve favorecido en que momento del periodo fecundo. Se discute actualmente que la concepción de niñas aumenta si la fertilización se lleva a cabo cercana al momento de la ovulación y lo contrario para la concepción de un niño, respetando claro los rangos de vida viable de cada uno de los gametos (France et al., 1984; James, 1980b; Pérez et al., 1985; Werren y Charnov, 1978). Aunque Labro y Papa (1984) citan a varios autores que aseguran mayor concepción de niños cerca de la ovulación.

Si bien, para los que apoyan este método, el momento de la ovulación es la clave, también es el problema, ya que es sumamente difícil determinar con exactitud el instante en que esta se lleva a cabo y, por ello, el momento óptimo de la cópula puede ser sugerido con poca confiabilidad. Bajo este sistema la ovulación es estimada a posteriori en base al registro de la curva térmica del ciclo menstrual de la mujer. Se dice que es estimada a posteriori ya que: a) es necesario registrar la curva térmica durante varios ciclos menstruales seguidos para así conocer que patron de estabilidad o no presenta la mujer en caso; y b) la parte más estable, en cuanto a tiempo se refiere, dentro del ciclo menstrual de la mujer (hay mujeres que presentan ciclos normales cortos desde 21 días y mujeres con ciclos normales largos de hasta 45 días) es la postovulatoria, cuya duración es de 11 a 14 días comúnmente (Labro y Papa, 1984), por lo que solo al momento de la menstruación se puede decir con alguna exactitud cuando sucedió la ovulación inmediata anterior.

Seguramente el registro de la temperatura basal de la mujer durante varios ciclos es un método de eficiencia aceptable en lo referente a la determinación de los días fértiles en la mujer (desde 5-7 días antes de la ovulación, hasta 1-2 días postovulación (France et al., 1984), aumentando las probabilidades de concepción y, solo en mujeres con ciclos extremadamente regulares, sería de alguna utilidad para seleccionar el sexo del futuro ser.

**Pico de LH.** Una manera más confiable de determinar el momento de la ovulación es mediante la medición de la LH. Se estima que el alza en la LH urinaria comienza aproximadamente 32 horas antes de la ovulación (France et al., 1984). Estos autores encontraron una concepción más alta de varones si la separación

entre el momento de la inseminación (coito) y la fertilización es mayor de 2 días (ver figura 1).

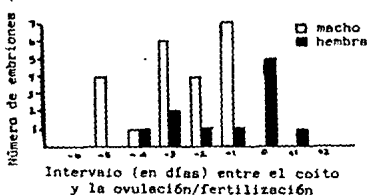


Figura 1. Relación entre el momento de la ovulación (alza en la LH urinaria) y la fertilización con la psn de la progenie. Tomado de France *et al.* (1984).

#### Estudio del fenómeno en otras especies

También en otras especies animales como el venado cola blanca (Verme y Ozaga, citados por Pratt, 1987), el hamster dorado (Pratt, 1987), y en especies inferiores (Charnov y Bull, 1989; Werren y Charnov, 1978), se han reportado diferencias en la proporción sexual al nacimiento (psn) según el momento de la fertilización a lo largo del periodo receptivo de cada especie en particular, periodo que permite estimar con mayor exactitud el momento de la ovulación que en el humano. Esto es particularmente cierto en las especies monotocas ya que en las politocas como la cerda y la perra las ovulaciones se van dando paulatinamente (Hafez, 1989; Concannon, 1983) y no todas al mismo tiempo; aunque siempre se puede distinguir un "periodo ovulatorio" más o menos circunscrito (24 horas entre la primera y la última ovulaciones en perras) (McDonald y Pineda, 1989).

En especies inferiores se ha observado que la ps puede ser adaptativa. En ocasiones se invierte la psn de los críos cuando la ps de los padres se desvía en favor de alguno de los sexos (Werren y Charnov, 1978). En aves, los ovocitos de pavo no fecundado pueden desarrollarse mediante partenogénesis (Campbell y Lasley, 1965) y las crías resultantes son machos algunos de los cuales pueden ser fértiles (hay que recordar que en aves el sexo homocigótico ZZ corresponde al masculino). En mamíferos no es tan clara una respuesta adaptativa pero al menos se puede sugerir que ciertos factores ambientales (dominancia social, época del año, disponibilidad de alimento, niveles hormonales, estrés, etc.) y factores genéticos, pueden influir en la psn (Charnov y Bull, 1989; Gomendio *et al.*, 1990; Hohenboken, 1981; James, 1989a,b; Meickle y Drickamer, 1986; Mitra y Chowdhury, 1989).

Hasta aquí se ha hablado solamente de la aparente relación existente entre la ovulación, la cópula y la psn pero no se ha profundizado para tratar de dar una explicación causal (etiológica) de esta relación.

**Evidencias empíricas (relaciones casuales) y evidencias hormonales (etiológicas) del momento de la cópula y la psn.**

Un investigador inglés de apellido James, ha realizado numerosas revisiones acerca de los factores que influyen en la psn. Debido a que este tema es más bien un complemento y no la parte principal del presente trabajo solamente se mencionan algunas de las relaciones casuales expuestas por James (1987a,b) y se resumirán sus conclusiones (hipotéticas aún) acerca de las relaciones causales (etiológicas), en su mayoría hormonales.

Entre las relaciones casuales observadas por diferentes autores y señaladas por James (1987a,b) se tiene:

- La raza. Los orientales registran mayor porcentaje de varones al nacimiento que los caucásicos y éstos que los negroides y a la inversa en cuanto al porcentaje de gemelos dicigóticos.

- Estación del año. Los trabajos que han reportado cierta estacionalidad sugieren que existe un mayor nacimiento de varones hacia el final del verano y disminuye hacia el final del invierno. También en animales algunos trabajos reportan cierta estacionalidad. Por ejemplo, Tomar y Tripathi (1990), en 420 nacimientos de búfalo Murrah, registraron una ps significativamente menor en los meses de abril a junio que entre octubre y marzo (.396 vs .578).

- La frecuencia en las relaciones sexuales. Cuando la frecuencia es mayor se ha observado aumento en la psn. James (1980, 1987a,b) explica que se debe a que en estos casos la fertilización se llevaría a cabo temprano dentro del periodo fecundo. Por ejemplo, se ha observado que en tiempos de guerra o poco después de ésta, o en recién casados (sobre todo en los primeros meses de matrimonio) el porcentaje de varones concebidos es mayor que en otras circunstancias y, es lógico pensar, que la frecuencia en las relaciones también haya sido mayor.

- Gemelos dicigóticos y sus hermanos. La psn entre los gemelos dicigóticos y entre éstos y sus hermanos, es alta, lo cual parece contradecir la hipótesis sobre la influencia que ejercen las gonadotropinas sobre la psn, contradicción que se aclara al final del inciso.

- Otras relaciones casuales. Edad de los padres, mujeres fumadoras, hombres que en edad madura padecen cáncer de próstata, dominancia social de alguno de los padres, brotes epidémicos de hepatitis y varicela y, tantas otras como la imaginación lo permita.

Las explicaciones etiológicas que James (1980, 1986, 1987a,b,c, 1988) intenta dar a las observaciones anteriores son, casi en su totalidad, del tipo hormonal. En sus hipótesis promueve que las gonadotropinas (especialmente la LH) favorecen la concepción de niñas y que los estrógenos y la testosterona la concepción de niños.

Corresponde ahora acomodar estas conclusiones a las observaciones casuales. En primer lugar, el aumento en los niveles de LH es drástico presentando una curva muy aguda. Este pico se da poco antes de la ovulación por lo que solamente alrededor de ésta y por un corto lapso de tiempo después esta hormona ejercería sus influencias sobre la ps primaria favoreciendo la concepción de niñas. Según Lenton et al. (1982), los niveles de estrógenos, en la mujer, llegan a su pico 1 día antes que el disparo de LH pero se mantienen a un nivel elevado durante varios días (3 o más) postovulación (principalmente en mujeres cuya ovulación resulta en concepción). En mujeres fumadoras, en las que los niveles de estrógenos están disminuidos, se ha visto que su descendencia presenta una psn ligeramente menor que la descendencia de las controles. También se ha sugerido que los niveles de testosterona en la madre y/o en el padre favorecen el nacimiento de niños. Sas y Szollosi (citados por James, 1987a,b), trataron a un grupo de pacientes hombres subfértiles con metilt testosterona de los cuales nacieron 62 niños de 92 (p < 0.005). James (1986), sugiere que existe una relación de dominancia de la LH sobre los estrógenos y la testosterona, es decir, que mientras los niveles de LH sean altos, los estrógenos y la testosterona ejercerán poca o nula influencia en el ps (ver figura 2).



/ La cópula durante este momento favorece la concepción de niñas.  
 + La cópula durante este momento favorece la concepción de niños.  
 \*Día 0 = día de la ovulación.

Figura 2. Niveles hormonales de LH y estradiol, y su relación con la psn de la progenie. Adaptado de Lenton et al. (1982).

Tomando en cuenta las hipótesis de James (niveles altos de LH favorecen la concepción de niñas y los estrógenos la de niños) la figura 2, nos muestra como el momento ideal para la concepción de una niña es en la etapa cercana a la ovulación (principal influencia de la LH) y en etapas anteriores o posteriores se ve favorecida la concepción de varones (mayor influencia de estrógenos). Mediante la determinación de la LH urinaria, France et al. (1984) encontraron una alta concepción de niñas si la relación sexual se lleva a cabo cerca del momento de la ovulación.

En cuanto a lo paradójico de la alta ps en gemelos dicigóticos y entre estos y sus hermanos (señalado anteriormente), se dice que es contradictorio ya que se estima que las mujeres que conciben mellizos tienen un nivel más alto de gonadotrofinas (que, como ya se dijo, favorecen la concepción de niños) comparándolas con las mujeres que presentan partos únicos. Pero, los estudios de Martin et al. (1984), reportan también que estas mujeres (las de partos gemelares) presentan niveles más altos de estrógenos y, Spellacy (citado por James, 1986), reporta mayores niveles de dihidrotestosterona (hormonas que favorecen la concepción de varones) lo cual prodria aclarar esa aparente contradicción.

En caso de que las conclusiones de James sean correctas, quedan aún muchas dudas por resolver, entre ellas: ¿en que momento es que estas hormonas afectan la ps; durante la gametogénesis, post coito y/o post conceptualmente y, de qué manera (a nivel molecular) es que influyen estas hormonas en los gametos y/o el cigoto?

## 2.3 TRATAMIENTOS VAGINALES

### Soluciones ácidas o alcalinas (aspectos bioquímicos)

Debido a que los espermatozoides pasan un tiempo considerable en el tracto reproductor de la hembra (desde la eyaculación hasta la fertilización) con objeto de sufrir la capacitación y situarse cerca del ovocito, se especula sobre si ciertas características fisiológicas como la temperatura, viscosidad del fluido mucoso y/o el pH, pueden afectar diferencialmente la longevidad, motilidad o la capacidad fertilizadora entre los espermatozoides portadores del cromosoma X o los portadores del cromosoma Y (Pratt *et al.*, 1987).

Ya desde 1939 se utilizan soluciones vaginales como intento para influir sobre la psn. Los promotores de este método recomendaban utilizar soluciones alcalinas de bicarbonato de sodio (2 cucharadas de bicarbonato en un litro de agua tibia) para favorecer la concepción de un varón y soluciones ácidas (2 cucharadas de vinagre en la misma cantidad de agua) para favorecer la concepción de una niña (Labro y Papa, 1984).

Pratt *et al.* (1987), observaron que en el hamster dorado existe correlación entre el pH vaginal, el tamaño de la camada y el momento de la cópula con la psn, la diferencia en la misma es mayor en los extremos en tiempo (dentro del estro) y en pH. En esta especie el pH es menos ácido al inicio del periodo receptivo (15 hrs del proestro), pero cuando el pH es más ácido (media = 6.75) se favorece el nacimiento de machos. Shettles (1987) cita a varios autores que reportan una migración más rápida de los espermatozoides Y de humano cuando el semen se deposita en moco cervical "ovulatorio", pero no hace referencia alguna al pH de este moco. Weir y Guerrero (citados por Pratt *et al.*, 1987), en sus reportes ofrecen estudios que parecen apoyar la hipótesis sobre la influencia que el pH tiene sobre la psn. Por ejemplo, Weir reporta una psn alta en una línea de ratones con pH sanguíneo más ácido que una línea con pH menos ácido.

Debido a que se piensa que una de las posibles influencias del pH es sobre la motilidad espermática, a continuación se menciona su interrelación con otros factores y como, en conjunto, influyen sobre la motilidad de los espermatozoides.

Factores que afectan la motilidad espermática En el estudio de los factores que afectan la motilidad espermática habrá que tomar en cuenta, además del pH, los niveles de Adenosin Monofosfato cíclico (AMPC), Adenosin Trifosfato (ATP) y Ca<sup>++</sup>, entre otros (Goltz, *et al.*, 1988). Por ejemplo, si el nivel de ATP es constante (2 mM ATP), a pH 6.6 el porcentaje de espermatozoides móviles es menor al 10% y, conforme aumenta el pH, aumenta también el porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de esta motilidad (82% de movilidad a pH 7.8). Pero si

añadimos AMPc el porcentaje de espermatozoides móviles a pH 6.6 es de 65% y, aunque también aumenta este porcentaje a pH más alto (7.8), la calidad y duración de la motilidad es mayor en pH ácido. En cuanto al  $Ca^{++}$ , este ión parece inhibir la motilidad (en relación al tiempo) a pH ácido pero no en pH alcalino (Goltz et al., 1988). Estos autores concluyen que el balance entre la activación ejercida por el AMPc y la desactivación ejercida por el  $Ca^{++}$  determinarán el estado de motilidad del esperma, siendo el pH el principal modificador de este balance.

Es difícil apoyar la hipótesis de que el pH a nivel vaginal pueda afectar substancialmente a alguno de los dos tipos de espermatozoides debido a las siguientes razones:

- El esperma eyaculado pasa muy poco tiempo dentro de la vagina (Labro y Papa, 1984). De hecho, en especies domésticas como la yegua y la cerda, el eyaculado se vierte directamente al útero (Hafez, 1989).

- Los líquidos seminales, en los cuales están embebidos los espermatozoides, tienen capacidad tampón por lo que hace que solamente cambios muy bruscos en el pH a nivel local (vaginal) ejerzan algún efecto en los espermatozoides; cambios de tal magnitud que lastimarían a la hembra haciendo imposible la cópula (Labro y Papa, 1984).

- Si bien es cierto que el pH ligeramente alcalino (7.4-8.0) favorece la motilidad espermática (Goltz et al., 1988; Hafez, 1989), no existe evidencia directa en la actualidad de que pequeñas variaciones a nivel vaginal, en cuanto al pH se refiere, influyan en forma diferencial la motilidad, longevidad y/o la capacidad fertilizadora de los espermatozoides X o Y. Por el contrario, se sabe que el medio vaginal inmoviliza a los espermatozoides en 1-2 horas post inseminación lo que hace esencial su paso al medio uterino lo antes posible.

- Por último, las fluctuaciones en el pH vaginal, bien pueden ser tan solo reflejo de otros cambios fisiológicos que ocurren en la hembra durante el periodo receptivo, siendo estos cambios los que tengan influencia en la ps y no las fluctuaciones en el pH vaginal (Pratt et al., 1987).

Diferencias en la mortalidad embrionaria entre sexos y diferencias entre la ps primaria y la ps secundaria. Es probable que las variaciones fisiológicas (llámense temperatura, pH, niveles hormonales, etc.) que se presentan en el tracto reproductor durante y después del periodo receptivo, afecten la supervivencia embrionaria en forma diferencial antes que a los espermatozoides, como se puede inferir de los datos sobre ps primaria y secundaria que aquí se exponen.

Aunque en su estudio (con el hamster dorado), Pratt et al. (1987, 1988), concluyen que no hubo variación estadísticamente significativa en el tamaño de las camadas de hembras



experimentales y controles, de los datos que reportan, se puede inferir una *ps* menor cuando el tamaño de la camada es inferior (8.4 cachorros con *psn* 0.37 en comparación con camadas de 12.6 con *psn* de 0.54). Bondioli *et al.* (1989) al sexar embriones por técnicas de hibridación del DNA obtuvieron un 60% de embriones con cromosoma Y que contrastan con la *psn* de 52.9 vs 47.1% (machos/hembras) en esta especie, según Powell (1975). James (1989), reporta mayor mortalidad prenatal de varones ya que la *ps* de los productos abortados es de 0.61 y sugiere que la *ps* primaria debe ser alta (mayor número de embriones XY) para que la *ps* secundaria (*psn*) se acerque al 0.5 presente en la naturaleza. Por el contrario, Yoshizawa *et al.* (1989a), al hacer el cariotipo de embriones de ratón recién fertilizados, encontraron una *ps* primaria de 0.452 (117 machos y 215 hembras), aunque en este caso los embriones se obtuvieron mediante tratamiento superovulatorio lo cual modifica los niveles hormonales de las hembras y, posiblemente, la *ps* primaria.

#### Solución vaginal a base de suero anti H-Y

Zavos (1983), utilizó en conejos otro tipo de solución vaginal a base de suero anti H-Y (antígeno que se expresa en células con cromosomas sexuales XY y, por tanto, exclusivo del sexo masculino; pag. 50) con el objeto de eliminar los espermatozoides Y y así desviar la *psn* en favor del sexo femenino. De las hembras tratadas nacieron 74.2% de crías del sexo femenino lo cual fue estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) con respecto a los controles. Por desgracia este método no ha mostrado amplia aplicabilidad según Wachtel (1984).

## 2.4 EFECTOS DADOS POR LA ALIMENTACION

En este inciso se tratan aspectos cualitativos (relación potasio-sodio/calcio-magnesio) y cuantitativos (restricción de la alimentación) y su posible influencia en la psn.

### Relación potasio-sodio/calcio-magnesio.

En 1935 Herbst (citado por Labro y Papa, 1984), al hacer estudios sobre la función de ciertos minerales en el gusano de agua *Borellia viridis*, encontró casualmente que al aumentar las concentraciones de potasio en el agua de los acuarios, aumentaba también la proporción de gusanitos de sexo masculino. Lo contrario se presentó al aumentar la concentración de magnesio si se disminuía al mismo tiempo la de potasio.

Estudios posteriores, entre ellos los de Stolkowski (en vacas) y Duc (en el humano; citados por Labro y Papa, 1984), fueron detallando más la influencia de ciertos minerales sobre la psn. Estos autores concluyeron que más que la cantidad de minerales en la dieta es la relación potasio-sodio/calcio-magnesio la que a fin de cuentas influye sobre la psn. En el humano, esta relación es superior a 4 para favorecer el nacimiento de un varón e inferior a 2 para la concepción de una niña (Labro y Papa, 1984).

Mitra y Chowdhury (1989), al suplementar la dieta de ratas con  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ , aproximadamente 15 días antes del apareamiento (proporción  $Na+K^{+}/Ca^{++}+Mg^{++} = 1$ ), observaron que la psn disminuyó en forma significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las controles.

Bird y Contreras (1986), obtuvieron resultados contrarios. Al estudiar la psn en ratas sometidas a diferentes niveles de sal común (cloruro de sodio) en la dieta, la proporción de machos decreció entre más alto fue el suministro de ésta. La psn en el grupo de dieta baja en sal (0.8%) fue de 0.6 y en el grupo de dieta alta en sal (4%) fue de 0.39.

En los dos estudios anteriores no hubo diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de las camadas entre los grupos experimentales o entre estos y los grupos control, con esto se descarta que la diferencia en la psn haya sido causada por mayor mortalidad embrionaria en alguno de los sexos.

Otra posibilidad, entonces, es que la variación en los minerales afectan directa o indirectamente la ps primaria. Boler (citado por Bird y Contreras, 1986), concluye que una dieta alta en sodio provoca un ambiente uterino más hostil por lo tanto nabra más huevos fertilizados por espermatozoides X que por espermatozoides Y, pues estos últimos son más frágiles. Stolkowski *et al.* (citados por Mitra y Chowdhury, 1989), concluyen

que la variación en la ps primaria se debe a cambios en el microambiente ovárico que provoquen modificaciones sexo selectivas en el ovocito.

Gliceril fosforilcolina diesterasa (GPC diesterasa), relación Na+K+/Ca++Mg++ y su influencia sobre la psn. Mann y White (citados por Mitra y Chowdhury, 1989), sugieren que la enzima glicerylfosforilcolina diesterasa (GPC diesterasa) puede jugar un rol muy importante en el metabolismo de los espermatozoides, el producto final de su acción enzimática (glicerofosfato) es oxidado por los espermatozoides permitiendo un incremento en el aprovechamiento de oxígeno. Mitra y Chowdhury (1989), proponen además que existe diferente motilidad entre espermatozoides X e Y y que la GPC diesterasa aumenta esta diferencia favoreciendo a los espermatozoides Y. En este estudio, encontraron que existió variación en la secreción de esta enzima previa a la concepción en las ratas del grupo experimental (suplementadas con Ca++Mg++) y que las madres con camadas de psn baja (mayor número de hembras) exhibieron baja actividad de esta enzima (figura 3).

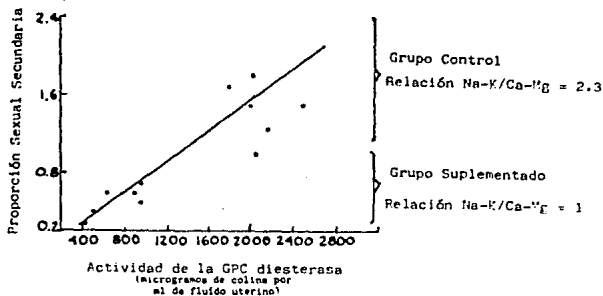


Figura 3. Actividad de la GPC diesterasa uterina, relación sodio-potasio/calcio magnesio de la dieta y psn. Tomado de Mitra y Chowdhury (1989).

## Perspectivas practicas del método.

El método aquí propuesto tiene, entre otras, dos características que resaltan a la vista:

- los minerales que se suplementan y la relación entre ellos y,
- el tiempo que se requiere suplementar la dieta antes del momento de apareamiento para que se modifique la *ps*. En las ratas la suplementación de minerales debe darse por 1-2 semanas (Bird y Contreras, 1986; Mitra y Chowdhury, 1989), en el humano se requiere un mínimo de 2 1/2 meses (Labro y Papa, 1984) antes del apareamiento.

Independientemente de si la *ps* (primaria y/o secundaria) se ve afectada por los niveles de minerales en la dieta, es necesario considerar aquí otros efectos que las variaciones en la suplementación mineral pueden ejercer, sobre todo pensando en animales en producción en los cuales las exigencias nutricionales son muy altas.

Limitantes de la suplementación de minerales para controlar la *psn*. seguramente en los animales de interés zootécnico como la vaca, oveja, cabra, cerda, etc., el tiempo requerido de suplementación de minerales para que el método sea efectivo sería de varias semanas o meses. Aunque los que están a favor de este método subrayan que es más importante la relación  $Na+K+/Ca+Mg++$  que su cantidad en la dieta, es difícil creer que, por muy bien planeada que sea esta suplementación, no se verá afectada la producción o inclusive la salud del animal. Sobre todo cuando la necesidad de modificar el suministro de estos minerales sea por un tiempo prolongado. Por ejemplo, tomando en cuenta que en la industria lechera se recomienda inseminar a las vacas 60-90 días postparto, el régimen se iniciaría a los 0-60 días postparto (si suplementamos por 1-2 meses). En esta etapa la vaca está amamantando al becerro y, para el momento al que llegue a su pico de producción láctea, llevara varias semanas con la nueva dieta. La cerda, cuya gestación dura poco menos de 4 meses y que se puede cargar a escasos 20-30 días postparto, estaría sometida a esta dieta durante el final de la gestación y/o durante la mayor parte de la lactancia. Stolkowski (citado por Bird y Contreras, 1986), reporta raquitismo y menor tamaño de la camada en la descendencia de ratas sometidas a dietas carentes de factores necesarios para la absorción de calcio.

A continuación se mencionan posibilidades de toxicidad o deficiencia características de estos minerales en las que se podría incidir si no se hace un cálculo cuidadoso de su suplementación. Además, se mencionan algunas características de la fisiología de estos minerales. Queda en manos de investigadores y especialistas en nutrición el dilucidar que tan factible sería utilizar este método para controlar la *psn* (en caso de mostrar su efectividad) en animales productivos.

- Sodio: junto con el cloro y potasio, tiene funciones importantes en mantener la presión osmótica, el equilibrio ácido-base, el tránsito de nutrientes hacia las células, la contracción muscular y el metabolismo del agua (Campbell y Lasley, 1985). Además se sabe que el sodio es secretado en leche en grandes cantidades. Por otro lado, su deficiencia produce falta de apetito, apetito deprimido, ("esta demostrado que en el ganado lechero solo existe apetito por el sodio y ninguno por otro mineral"; Escobosa, 1987), disminuye la producción láctea (Arbiza, 1987; Escobosa, 1987). Los signos de toxicidad del sodio son: diarreas, temblor muscular y otros.

- Potasio: su consumo en proporción alta interfiere con la absorción de magnesio (Arbiza, 1987; Escobosa, 1987). La deficiencia produce problemas cardíacos (Campbell y Lasley, 1985).

- Magnesio: su deficiencia produce tetania de los pastos, convulsiones, opistotonos, etc. (Campbell y Lasley, 1985).

- Calcio: se secreta en leche en grandes cantidades. Cuando la deficiencia es crónica se agotan las reservas del esqueleto blando (cráneo, vértebras, mandíbulas, costillas) especialmente durante la preñez (parésis del parto) y lactancia (Campbell y Lasley, 1985).

Por si fuera poco, Escobosa (1987), añade una variable más que hay que controlar, el agua. Y dice: "... el agua es una fuente importante y frecuentemente subestimada de minerales. Puede influir decisivamente sobre los minerales requeridos en el suplemento y sobre la disponibilidad biológica de los minerales de la ración".

En definitiva, si este método tiene alguna aplicabilidad en la explotación de ganado productivo, no será fácil hallar la solución o soluciones para cada caso en particular.

#### **Restricción de la alimentación.**

Mitra y Chowdhury (1989), en su estudio con ratas, y Melckie y Drickamer (1986), utilizando ratones, al restringir ligeramente la alimentación días antes del apareamiento programado observaron efectos muy similares al propuesto con la suplementación de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ . La ps fue significativamente menor en las camadas de hembras sometidas a la subalimentación. La restricción en estos casos consistió en privar a los roedores de alimento en días alternos (los días que se les suministró alimento lo consumieron *ad libitum*).

En el estudio de Mitra y Chowdhury (1989), en el que alternativamente se midió la actividad de la GPC diesterasa del

fluido uterino, el grupo de hembras con alimentación restringida mostró disminución en la actividad de esta enzima al igual que las hembras en el grupo suplementado con  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  (mencionado anteriormente), siempre y cuando no tuvieran más de 7 días bajo el régimen de restricción. En cambio, cuando la subalimentación se prolongó hasta 21 días, se abolió el decremento en la actividad de la enzima restaurándose la normalidad.

Previamente, Meickle y Drickamer (1986), habían observado que cuando a un grupo de ratas se le restringía ligeramente la alimentación, comenzando 7 días antes de la fecha programada de apareamiento, la  $psn$  sí variaba (disminuyendo). Pero en un grupo alterno, en el que la restricción se inició 14 días antes de la fecha de apareamiento las camadas presentaron  $psn$  sin diferencia con respecto al grupo control. Estos autores, sugieren que en sí el efecto de restringir la dieta genera un estrés, el cual puede influir en la fisiología reproductiva al afectar el eje pituitaria-adrenocortico-gonadal, haciendo variar la  $ps$ . Así, las hembras sometidas al régimen más prolongado tendrían tiempo para "adaptarse" antes del apareamiento, eliminándose el "efecto estrés".

Casi cualquier nivel de estrés en el animal, incrementa la producción de ACTH, esta a su vez incrementa la secreción de glucocorticoides (los principales son cortisol y corticosterona). En el hombre, cerdo y perro, predomina la secreción de cortisol y, en conejos, ratas y ratones la de corticosterona (Mc Donald y Pineda, 1989). Kamel y Kubajak (1987), encontraron que la corticosterona inhibe la secreción de LH en cultivos de células de pituitaria de rata tanto directa como indirectamente (disminuye el efecto estimulador de los estrógenos sobre la secreción de LH y aumenta el efecto inhibitorio de la testosterona). Suponiendo que fuera correcta la hipótesis de James (1986), en la que los niveles altos de LH favorecen el nacimiento de hembras, el estrés producido por la restricción en la alimentación no explicaría la menor  $ps$ .

Otra posibilidad es el decremento en la actividad de la GPC diesterasa observado en el estudio de Mitra y Chowhury (1989). En la figura 3 se observa la relación entre los niveles de GPC diesterasa uterina y la  $psn$ .

**CAPITULO III**

**M E T O D O S   P A R A   S E X A R   E L   E S P E R M A**

### III METODOS PARA SEXAR EL ESPERMA

#### 3.1 INTRODUCCION

Como es bien conocido, la diferenciación sexual está determinada genéticamente por los cromosomas sexuales X y Y (en la mayoría de los mamíferos; Pinkel *et al.*, 1982a). Las hembras poseen células somáticas homogaméticas XX y los machos heterogaméticos XY. Por tanto, las hembras producen gametos con cromosoma sexual X únicamente y, en cambio, los machos producen gametos de 2 tipos (tanto X como Y) en iguales proporciones. Es por esto que se dice que el sexo de la descendencia depende del macho, concretamente, del cromosoma sexual que porta el espermatozoide recundante (Burgoyne, 1987; Page *et al.*, 1987).

Debido a estas diferencias genéticas cualitativas y cuantitativas entre ambas poblaciones de espermatozoides, se ha especulado mucho sobre las diferencias potenciales morfológicas, (tamaño, peso, forma), fisiológicas (motilidad, supervivencia, resistencia al medio, expresión génica, etc.) y/o fisicoquímicas (cargas eléctricas, antígenos de superficie, etc.) cuya detección y comprensión precisas permitirán crear métodos confiables para seleccionar el sexo de la descendencia por medio de tratamientos específicos del semen (Amann, 1989; Giednili, 1983, 1988; Pinkel, *et al.*, 1982; Pratt *et al.*, 1987). Igualmente permitirán crear métodos que ayuden a evaluar la efectividad de los anteriores. Los fracasos, tan comunes en el pasado, parecían reafirmar el razonamiento que Beatty (citado por Giednili, 1983) comenta: "... la Naturaleza, habiendo pasado por todo el problema de lograr cierta proporcionalidad entre los sexos es improbable que haya dado diferentes genotipos a los espermatozoides portadores de los cromosomas X o Y, con el peligro de que fluctuaciones ambientales tortuosas afectasen a un tipo de espermatozoides más que al otro, lo que provocaría fluctuaciones incontrolables en la proporción".

La realidad es que técnicas recientes (Amann, 1989; Jonsson *et al.*, 1989; Pinkel *et al.*, 1982) han logrado detectar algunas de estas diferencias por lo que es probable que a corto plazo se creen métodos con certeza cercana al 100% y, por tanto, universalmente aceptados. La efectividad de estas técnicas está dada por que se han detectado diferencias pequeñas entre ambos grupos de espermatozoides y más aún por producir "gradientes microambientales" de magnitud tal que influyen específicamente sobre alguna o algunas de estas diferencias, cosa que sería muy difícil que se diera de forma natural. Aun ahora, y a pesar de las técnicas, o mejor dicho, de sus creadores, cabría citar nuevamente a Beatty (1974): "No parece haber al presente alguna técnica que de un grado substancial de control de la proporción de los sexos fácilmente repetible en numerosos laboratorios. Hallazgos positivos estadísticamente



significativos han sido publicados pero no todos los de resultado negativo, influyendo de esta manera la literatura mundial".

**Consideraciones económicas en la experimentación y en la práctica.** Para que alguno de los métodos del sexado espermático reciba amplia aceptación debe mostrar su efectividad en varios experimentos y con eyaculados provenientes de diferentes machos. Un mínimo de 50 embriones o animales nacidos deben considerarse para la evaluación del semen tratado y un número igual debe utilizarse para el grupo control. Según Amann (1989), en un experimento ideal se tendrían que utilizar 6 eyaculados (3 experimentales y 3 controles) de cada uno de 5 toros y llevar a cabo alrededor de 6000 inseminaciones para obtener información contante de 100 embriones o crios nacidos tanto para el grupo control como para el experimental.

Experimentos como el mencionado arriba suponen una inversión impresionante que solo tiene caso llevar a cabo si se estima que a la larga resultara en un beneficio económico importante. Taylor et al. (1988), de la Universidad de Texas, hicieron una evaluación de la posible influencia que ejercería un método 100% efectivo. Sin aumento del costo del semen, el valor neto promedio por unidad de semen en 5 toros Holstein estudiados se incrementó de 3.41 dólares a 13.43 dólares y de 20.58 dólares a 48.76 dólares cuando el precio por litro de leche era de 0.13 y 0.23 dólares, respectivamente. En la actualidad el obtener semen 100% enriquecido es utópico, pero se piensa que pronto se logrará uno de un 80% de pureza. En este mismo estudio, los autores concluyeron que los granjeros pueden pagar 5.81 y 16.91 dólares más por unidad de semen 80% enriquecido con los precios por litro de leche antes indicados.

En México el precio al público de las dosis de inseminación de empresas públicas y privadas para el segundo semestre de 1990, fue de unos cuantos miles hasta más de 100,000 pesos (Iniestra y Rico, 1989). Cortes (1990), hizo una proyección sobre el costo de producción de dosis de inseminación utilizando semen de toros importados y fue de \$5,243. Con los rangos en precio y con el costo de producción, seguramente los ganaderos nacionales podrían aroncar sin mayores problemas un alza en el precio por dosis de inseminación siempre y cuando se les asegure un 80% o más de éxito en controlar la psn de su ganado con semen sexado de fertilidad aceptable.

**Parámetros en inseminación artificial con semen no sexado.** El índice de preñez es un parámetro muy importante para evaluar la calidad fertilizadora del semen. Por desgracia existen muchos factores independientes de la calidad seminal que en conjunto influyen sobre el índice de preñez, como: la habilidad del técnico para manejar el semen y el lugar donde lo deposita, el momento de la inseminación dentro del periodo fértil, intervalo parto a primer servicio, etc. Otros factores, hasta cierto punto, dependientes de la calidad del semen son: número de servicios por concepción, concentración celular de la dosis inseminada y especie animal.

En la practica, en estadios lecheros el indice de preñez del nato está intimamente relacionado con el numero de servicios por concepción, este a su vez depende en gran parte del tamaño del nato y del intervalo entre partos. En términos generales es aceptable un indice de preñez del 50 al 80% con 1.4, 1.8 y 2.2 servicios por concepción para natos chicos (promedio = 100), medianos (promedio = 500) y grandes (> 1000 vientres) con un intervalo entre partos de 90, 60 y 45 días, respectivamente (Perez, comunicación personal).

Varios de los métodos que aquí se exponen, fueron ideados originalmente para incrementar la motilidad y la calidad en general del semen de personas subfértiles. El objetivo final de la separación de espermatozoides es el utilizar estas técnicas para la inseminación en forma comercial. Por tanto, es requisito indispensable que el esperma se recupere en porcentaje, concentración y motilidad deseables después del tratamiento. De la misma manera, el indice de preñez con semen sexado debe presentar los mismos indices de fertilidad que el semen no sexado. Por ejemplo, en el ganado bovino, los parámetros promedio que guardan las dosis de inseminación producidas por diferentes compañías nacionales son: motilidad, >65%; concentración, 12 millones de espermatozoides; y no mas del 10% de espermatozoides anormales (Iniestra y Kico, 1989).

**Clasificación de los métodos para sexar el semen.** Se han descrito varios métodos para sexar el esperma. En este trabajo se clasifican según la cualidad de los espermatozoides que pretenden explotar para su separación. Pero, como toda clasificación, adolece de un defecto: no se puede hacer una división tajante (y menos con material biológico) de conceptos relacionados entre sí. Algunos de los conceptos ocupan mas de un lugar dentro de la clasificación o algunos de los métodos se combinan entre sí y se pueden utilizar para explotar mas de una característica.

Las cualidades espermáticas, base de la clasificación que se tomaron, son:

- Características superficiales : antígenos, cargas eléctricas, morfología, etc. Algunos de los métodos que pretenden explotar alguna de las características señaladas son: separación inmunológica, electrorroresis, técnicas diferenciales.

- Características internas: peso, densidad, motilidad, etc. Algunos de los métodos son: separación en gradientes de albúmina, separación, cromatografía en columna, separación por centrifugación en gradientes de densidad (continua o discontinua), separación de flujo.

La efectividad de estos métodos debe corroborarse a su vez por medio de técnicas alternas (cariotipo, citometría de flujo, etc.) o al nacimiento de los crios. Se duda de la efectividad de algunas de estas técnicas alternas (v. gr. tinción del cromosoma Y con quinacrina) para identificar las poblaciones de espermatozoides enriquecidas o no por lo que a los espermatozoides se les llamara X- o Y-putativos cuando se haya utilizado alguna de estas como medio de comprobación.

### 3.2 SELECCION DE ESPERMATOZOIDES MEDIANTE LA DETECCION DE CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE SUPERFICIE

#### Separación inmunológica de espermatozoides (detección de antígeno H-Y)

El antígeno histocompatibilidad Y (H-Y) es considerado macho específico y puede ser identificado seriológicamente in vitro (Koo, 1981; Wachtei, 1975a, 1984; Wiberg, 1987). Ha sido localizado en la región posterior de la cabeza y en la región media del tiago en espermatozoides del ratón, humano, carnero y bovino (Amann, 1989; Bradley, 1989; Bradley et al., 1987; Iyer et al., 1989; Sarkar et al., 1984).

En tejido testicular se ha localizado en la membrana de células de Sertoli y en citoplasma de células de Leydig, también en células columnares de epidídimo (Iyer et al., 1989).

Las pruebas inmunológicas utilizadas más comúnmente para su detección son: inmunofluorescencia indirecta (IFI; Bradley et al., 1987; Hinrichsen-Kohane et al., 1985; Iyer et al., 1989), enzima-inmunoensayo (ELISA; Bradley et al., 1987; Iyer et al., 1989), citotoxicidad celular (Goldberg et al., 1971), microcitotoxicidad (Iyer et al., 1989) y pruebas inmunohistoquímicas (Bradley, et al., 1987; Iyer et al., 1989). Los espermatozoides como los demás tipos celulares presentan gran cantidad de antígenos en su superficie por lo que se hace necesaria la utilización de anticuerpos monoclonales con el fin de aumentar la especificidad de las pruebas (Hinrichsen-Kohane et al., 1985).

Pensando en que la presencia de este antígeno macho específico sea producto de la expresión génica haploide en espermatozoides portadores del cromosoma sexual Y, se intentó la utilización conjunta de suero anti H-Y y complemento (prueba citotóxica) para eliminar la mayor parte de los espermatozoides que presenten este antígeno en su membrana celular. Así, el esperma restante quedaría enriquecido en espermatozoides con cromosoma sexual X (Goldberg et al., 1971). Este esperma resultante serviría para desviar la psn en favor de las hembras. Así (citado por Bradley, 1988) mediante la técnica de IFI, en la cual no se utiliza el complemento, pudo distinguirse dos poblaciones de espermatozoides (H-Y positivos y H-Y negativos) en proporción aproximada de 50:50 lo que concuerda con la hipótesis sobre el antígeno H-Y como macho específico.

Hay razones teóricas para creer que el antígeno H-Y está presente en proporciones similares tanto en espermatozoides Y como en los X (Amann, 1989). Esto puede deberse a: que los espermatozoides en general conserven parte de la membrana de las

celulas menos diferenciadas y diploides que les dieron origen (Goldberg et al, 1971); a que antígeno presente en el medio (las celulas de Sertoli secretan este antígeno a la luz de los estudios seminíferos; Bradley, 1989) sea adsorbido en la membrana plasmática de los espermatozoides; o bien, al paso de RNAm o proteínas de espermática a espermática a través de los puentes citoplasmáticos que las conectan (pag. 75; Braun et al., 1989). En capítulos posteriores se abordara sobre la especificidad o no de este antígeno como macho específico, la producción de antisuero H-Y y las pruebas utilizadas para su detección (págs. 49-57).

A continuación se hace una breve reseña de algunos de los trabajos que se han realizado intentando separar el espermatozoides en 2 poblaciones mediante la detección de este antígeno.

Goldberg (1971), en un estudio con espermatozoides de ratón, utilizo una prueba citotóxica con el objeto de eliminar a los espermatozoides H-Y+. Las celulas dañadas las evaluo mediante la tinción supravital de tripan azul (en la que se tienen solamente celulas muertas). En no pocas ocasiones se tuvieron un número de celulas superior al 50%. Encontró también que existe diferente susceptibilidad del espermatozoides al antisuero H-Y según la cepa de ratones de la que se obtuvo el eyaculado evaluado. Estos hallazgos ponen en duda la especificidad de este antígeno como exclusivo de celulas con cromosoma sexual Y.

Zavos (1983), estudiando un tipo de tratamiento vaginal, incubo el espermatozoides en un medio con antisuero H-Y y trató con soluciones vaginales (a base de este antisuero) a conejas previamente a su inseminación. Después de una hora de incubación disminuyó la motilidad del espermatozoides tratado en un 28.5%. Este resultado coincidió con la reducción en el porcentaje de machos nacidos (-29.8%) de las hembras tratadas previamente a su inseminación en comparación con los machos nacidos de las hembras control. En el primer caso la ps fue de 0.258 y en el grupo control la ps fue de 0.556. Estadísticamente hablando el índice de preñez y el tamaño de la camada de las hembras tratadas no variaron comparados con los parámetros obtenidos con las hembras apareadas naturalmente. Esto indica que la variación de la ps no se debió a diferencias de mortalidad en los embriones en ambos grupos.

All (1987), llevo a cabo la separación de las 2 poblaciones de espermatozoides mediante un Separador Celular Activado por Fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Los espermatozoides primero se incubaron en antisuero H-Y y, después de un lavado, los marco con un conjugado de anticuerpo y colorante fluorescente (este segundo anticuerpo va dirigido contra el primero) y por último los sometió a la separación. Después de la separación la tasa de los espermatozoides y putativos (marcados) fue de: 24:76, 12:88 y 23:77. La tasa de los espermatozoides X putativos para esos mismos animales fue de: 74:26, 65:35 y 77:23.

respectivamente. Este método (FACS), separa relativamente pocas células por minuto además de que afecta la viabilidad de las células por lo que no se pueden realizar desarios de inseminación (Bradley, 1988).

Bradley (1988), reporta la separación de espermatozoides durante su paso en una columna a base de camas de Setarosa-6MB y anti-IgG de rata. Los espermatozoides primero se incuban en antisuero H-Y y, posteriormente a un lavado, se hacen pasar por la columna de Setarosa. Los espermatozoides no fijados en esta columna se hacen pasar mediante lavados sucesivos hasta que ya no se observan más espermatozoides al microscopio. Los espermatozoides fijados específicamente (Y putativos) son eluidos al añadir un exceso de suero no inmune. Ambas fracciones fueron tenidas con un conjugado de isocianato de fluoresceína + anti-IgG de rata y evaluados al microscopio. Del 70 al 80% de los espermatozoides no fijados específicamente en la columna no mostraron fluorescencia (H-Y negativos) y, alrededor del 80% de los fijados específicamente sí la mostraron (H-Y positivos). En este experimento sólo fue recuperado un bajo porcentaje del volumen espermático original, además los espermatozoides recuperados mostraron baja viabilidad.

Zavos (citado por Amann 1989), utilizó una columna inmunofiltradora con anticuerpos monoclonales anti H-Y con el objeto de que los espermatozoides Y quedaran fijos en ésta y así el semen recuperado estaría enriquecido en espermatozoides X. De 198 embriones obtenidos con semen procesado de 6 toros, pudo sexar 127 mediante cariotipo y de estos el 81 % fueron hembras.

Aunque todos estos métodos han demostrado la existencia de 2 poblaciones de espermatozoides en relación a la presencia del antígeno H-Y en su superficie, es necesario comprobar que realmente correspondan los H-Y negativos y los H-Y positivos a los espermatozoides X y Y, respectivamente. Además, a excepción de los experimentos de Zavos citados anteriormente, todos los métodos mencionados arriba tienen que vencer serias contrariedades antes de hallar aplicabilidad en la reproducción animal y los de Zavos tiene que mostrar su efectividad en otros laboratorios y con otras especies animales.

## Electroforesis de flujo libre (detección de cargas de superficie)

La electroforesis es un método que sirve para separar moléculas (sometidas a un campo eléctrico y dentro de un sistema que permita el flujo) de acuerdo a la carga neta + o - que presenten a un pH dado.

Gledhill (1988), señala que No hay razón a priori para pensar que los espermatozoides X o Y difieran en cargas de superficie. Así, en un campo eléctrico algunos espermatozoides se mueven hacia el ánodo y otros hacia el cátodo. La velocidad de migración de los espermatozoides hacia alguno de los campos eléctricos depende de la densidad de carga eléctrica en su superficie (Kaneko et al., 1984).

En esta técnica, el espermatozoide y la solución en la que nada fluyen perpendicularmente a un campo eléctrico por lo que la separación debería estar dada (en caso de que este método no inmovilizará a los espermatozoides) tanto por diferencias de motilidad como por diferencias de carga (Amann, 1989).

Kaneko et al (1984), en un estudio en el que lavaron espermatozoides humano para eliminar el plasma seminal, lo sometieron a electroforesis de flujo a pH 7.4 dentro de una cámara en la que pueden ser recolectadas hasta 20 diferentes fracciones. El destino de los espermatozoides depende de la influencia que el campo eléctrico ejerce sobre ellos. Por medio de monitoreo con cámara de video y análisis computarizado registraron 2 picos de migración, ambos dirigidos hacia el ánodo. Después del tratamiento tuvieron los espermatozoides con quinacrina (colorante nuclear que tiene "especificamente" al cromosoma Y, conocido como corpusculo fluorescente o corpusculo-F). Encontraron que los espermatozoides que migraron más rápido hacia el ánodo no se tuvieron en absoluto (X-putativos) y los del segundo pico se tuvieron en un 83-84% (Y-putativos); los espermatozoides de la muestra control se tuvieron en un 46-48%. En este estudio concluyeron que los espermatozoides X-putativos presentaron una carga neta negativa mayor que los Y putativos, y que esta carga se debe, aparentemente, a diferente contenido en ácido siálico en la membrana plasmática. Esta hipótesis la basan en la observación de que la migración hacia el ánodo de ambas poblaciones y la migración diferencial entre ellas disminuyó en muestras de espermatozoides tratadas con siálicidasa.

Engelmann et al. (1988), obtuvieron resultados completamente distintos, en este caso los espermatozoides que se tuvieron con quinacrina (Y-putativos, 80%) fueron los que migraron más rápido hacia el ánodo. Las fracciones de espermatozoides más cerca del cátodo fueron casi 100% X-putativos (figura 4). Evaluaron también el contenido de ácido siálico en el plasma seminal y en la membrana plasmática de espermatozoides y encontraron que este es

3 y 5 veces mayor, respectivamente, que el presente en plasma sanguineo. Estos autores citan a Schilling *et al.* que al utilizar el espermatozoide de animales domesticos para inseminacion tratado mediante este metodo, obtuvieron una psn mas alta al utilizar los espermatozoides que migraron hacia el anodo y mayor numero de hembras con los espermatozoides que migraron hacia el catodo.

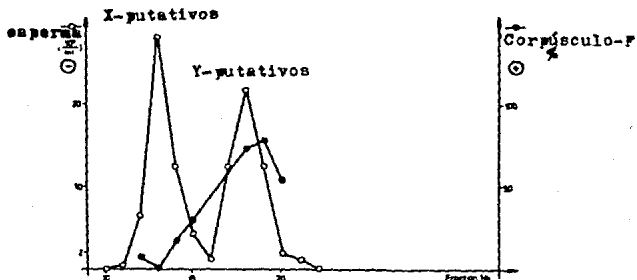


Figura 4. Migración de espermatozoides X e Y en un campo eléctrico (ver texto). Tomado de Engelmann *et al.* (1988).

### 3.3 SELECCION DE ESPERMATOZOIDES MEDIANTE CARACTERISTICAS DIFERENCIALES INTERNAS

#### Separacion en Gradientes de Albumina

En 1973 fue patentada una de las técnicas más conocidas en el campo de la separación espermática. Ericsson et al. (1973), lograron aislar fracciones ricas en espermatozoides Y al colocar esperma humano sobre columnas de albumina serica bovina con bajos contenidos de sal.

La base de la separación es la motilidad progresiva y la aparentemente mayor habilidad de los espermatozoides Y para atravesar la interfase entre fluidos de diferente densidad. Los espermatozoides de la fracción recuperada presentan motilidad progresiva y velocidad altas (Beernink y Ericsson, 1982.; Ericsson et al., 1973; Quinnivan et al., 1982). Además de seleccionar los espermatozoides Y, el esperma tratado está libre de espermatozoides no móviles, de espermatozoides de morfología anormal y de material contaminante (células germinales, células epiteliales, detritus, material particulado, etc.).

Los espermatozoides, principalmente los Y, migran hacia la columna de albumina en 1 hora. Todo el experimento dura de 3 a 5 horas desde la recolección del semen (Dmowski et al., 1979; Gledhill, 1988). La identidad de los espermatozoides en cuanto a que cromosoma sexual portan fue evaluada mediante la tinción de quinacrina en la mayoría de trabajos que reportan éxito utilizando esta técnica (Ericsson, et al., 1973; Dmowski et al., 1979; Quinnivan et al., 1982; Corson et al., 1984). Esta tinción solamente tinte el cromosoma Y de humanos y de algunos primates por lo que no puede ser utilizado en animales domésticos, aunque otros autores afirman lo contrario (Ogawa et al., 1988; Sidhu et al., 1988a,b).

Los pasos generales que corresponden al método básico de un paso (Ericsson et al., 1973) son:

- Diluir el eyaculado en proporción 1:1 en solución Tyrode y se centrifuga X 15 minutos a 4000 r.p.m.

- Se recupera el botón de espermatozoides y son resuspendidos en solución Tyrode a razón de 100 millones/0.1 ml y se evalúa su motilidad, y morfología.

- Se diluyen los espermatozoides a concentración final de 50 millones/0.5ml en solución Tyrode.

- Se prepara la columna de albumina en una pipeta Pasteur capilar, 0.9ml a pH 7.4-7.6. La concentración puede ser de 3 a 25%.



- Se cubre esta columna con la alícuota de 0.5ml antes señalada.

- Se remueve la fracción superior después de 1 hora y se evalúan por separado.

La fracción superior siempre mostrará espermatozoides de motilidad y morfología deficientes y al contrario para los espermatozoides que penetraron en la columna de albúmina.

Este método se puede modificar realizando más de 1 paso (2 ó 3). Para esto, se recupera la fracción inferior, se centrifuga, se elimina el sobrenadante y rediluyen los espermatozoides (misma concentración y volumen). Esta alícuota 2 se coloca sobre una nueva columna de albúmina de mayor densidad que la del paso 1 y lo mismo para el tercer paso. Cada paso se realiza en un lapso de 1 hora.

Otra variante del método que se puede utilizar es el de 1 paso en columna de albúmina con diferentes densidades. Por ejemplo, una columna cuyas concentraciones sean 10, 15 y 25% de 0.3ml c/u y decreciendo en densidad de arriba-abajo. El método de 3 pasos 3 densidades parece ser el que mejor funciona (Beernink y Ericsson, 1982; Beernink et al., 1988; Ericsson et al., 1973).

El éxito en el enriquecimiento de espermatozoides mediante este método puede ser superior al 75% (Beernink y Ericsson, 1982; Beernink et al., 1988; Corson et al., 1984; Ericsson et al., 1973; Quinnlivan et al., 1982). La motilidad se ve generalmente mejorada (aún en estudios en los que se reporta fracaso en la separación), siendo común que sea superior al 90% (Beernink y Ericsson, 1982; Corson et al., 1984; Ericsson et al., 1973; White et al., 1984; Zavos, 1985).

En animales domésticos existen pocas investigaciones en las que se haya intentado utilizar el procedimiento. En uno de los pocos trabajos que se reporta éxito en animales, White et al. (1984), mediante un método algo diferente al arriba expuesto, obtuvieron un 75% de machos nacidos (n=25) al inseminar a ovejas con semen obtenido de la porción inferior de la columna (6ml) post centrifugación. Estos autores utilizaron también la porción superior (2 ml) con la idea de que estaría enriquecido en espermatozoides X, después de centrifugarla y resuspender el sedimento, inseminaron a las hembras. Nacieron un 63.3% de hembras (n=22). Los índices de fertilidad fueron del 58.1 y 47.7% para las fracciones inferior y superior, respectivamente. Zavos (1985), no obtuvo resultados positivos utilizando la técnica de Ericsson et al. (1973), en la separación de espermatozoides de conejo.

Volviendo a los estudios en humanos, Quinnlivan et al. (1982), encontraron que el grado de separación en muestras individuales mostraba una variación considerable, lo que explica

en parte los resultados contradictorios publicados en diferentes reportes. También en lo referente a la cantidad de espermatozoides recuperados los resultados son muy variables, desde 1-5% hasta 44% de recuperación.

Varios autores ponen en duda la efectividad de esta técnica en la separación de los espermatozoides en dos poblaciones sexo distintivas. Pero, debido a lo contundente de los resultados obtenidos en numerosos centros de inseminación humana en los que se utiliza el método de separación espermática mediante columnas de albúmina donde la pbn ha sido alta (>75%; Beernink y Ericsson, 1982; Beernink *et al.*, 1989), varios autores, incluyendo a los detractores de la técnica, especulan sobre otras posibles formas de acción. Por ejemplo, si la efectividad de este método se basa más bien en alterar diferencialmente la capacidad fertilizadora de ambas poblaciones espermáticas y no en el enriquecimiento de espermatozoides Y. Schenck y Amann (1987), demostraron que la albúmina sérica disminuye la capacidad fertilizadora en el 18 a 24% de los espermatozoides al activar prematuramente la reacción acrosomal, aunque no determinaron si hubo diferencia entre poblaciones X o Y. Snettles (1987), señala que la inseminación artificial periovulatoria (con este tipo de semen) podría resultar en una migración diferencial entre espermatozoides X y Y ya que en pruebas in vitro se ha visto que los espermatozoides Y nadan más rápido en moco cervical periovulatorio.

Tinción de Quinacrina. ¿específica para cromosoma Y? Existe la duda sobre si la tinción de quinacrina es útil para identificar el cromosoma Y humano (Thomsen y Nieduhr, 1986), dejando incierta la efectividad de los métodos para separar espermatozoides que utilizaron esta tinción como medio de comprobación. La especificidad de la quinacrina (como tinción para cromosoma Y) ha sido evaluada con técnicas de mayor aceptación. Por ejemplo, al realizar el cariotipo de embriones híbridos producidos mediante la fertilización de ovocitos de hamster denudados con espermata sexado por gradientes de albúmina. Brandt *et al.* (1986) y Ueda y Yanagimachi (1987), no encontraron una ps alta como se esperaría si en realidad el espermata estuviera enriquecido con espermatozoides Y. Aun más consistentes son los hallazgos obtenidos mediante citometría de flujo, que como se explica posteriormente (pag. 36, 97-100), mide la cantidad de DNA celular en forma bastante precisa. Las diferencias porcentuales en la cantidad de DNA entre espermatozoides X y Y en animales domésticos y el humano es del 3 al 4.5% (Garner *et al.*, 1983; Pinkel *et al.*; 1982a). Mediante esta técnica no se encontró enriquecimiento alguno del semen bovino tratado con ese fin (Pinkel *et al.*, 1985).

McDonough (1987) señala que la porción fluorescente del cromosoma Y puede ser pequeña o no existente en algunos hombres e inclusive, algunas mujeres pueden presentar satélites fluorescentes y centrómeros fluorescentes. Además, en varios trabajos no se ha visto enriquecimiento de los espermatozoides corpúsculo-F positivos post-tratamiento (Amann, 1989; Gledhill, 1986; Ueda y Yanagimachi, 1987).

Aunque el panorama para el futuro de esta técnica en el área de producción animal es sombrío, su utilización en reproducción humana dista mucho de ser desechada. En el sector pecuario se necesita la realización de mayor investigación para conocer su valía y aplicabilidad.

#### **Cromatografía en columnas de setadex**

Al contrario del método anterior, con esta técnica se pretende el aislamiento de espermatozoides X. En resumen, se deposita 1 a 2 ml de semen fresco sobre una columna de 1.08 X 12 cm de gel de Setadex. Para filtrar el semen se añade solución de Locke a una temperatura de 22-23 grados centígrados. Se desechan los primeros 3-4 ml y se recolectan fracciones de 1 ml. La máxima concentración se obtiene en los primeros nueve tubos recuperándose un 35% de espermatozoides (Quinnivan et al., 1982). La motilidad mejora substancialmente y el porcentaje de espermatozoides corpusculo-F negativos (X- putativos) se incrementa alrededor de un 23% (Corson et al., 1983; Corson et al., 1984; Quinnivan et al., 1982).

Adimoelja (citado por Gledhill 1988), en un estudio de 8 años con parejas voluntarias, obtuvo un 100% de éxito, de 48 partos nacieron 48 niñas. De entrada suena impresionante pero la realidad es que el estudio lo iniciaron 269 parejas. Tan alta deserción no permite tomar como definitivos estos resultados.

Fernandez et al. (1986a), argumentando diferente peso y velocidad entre los espermatozoides X e Y, lograron separar subpoblaciones enriquecidas en espermatozoides Y y subpoblaciones enriquecidas en espermatozoides X utilizando semen bovino. El proceso de separación, dicen, se lleva a cabo al eluir el semen a través de una columna de setadex a una velocidad igual a la velocidad media de los espermatozoides a temperatura constante (34.5 grados centígrados), donde los espermatozoides son arrastrados a diferente velocidad. La velocidad promedio de migración de los espermatozoides fue medida al momento de evaluar la calidad del eyaculado y, después de procesado, a cada una de las fracciones recolectadas. Según estos autores los

espermatozoides recogidos en las primeras fracciones son los X menor velocidad) y los recogidos en las últimas fracciones son los Y. Se inseminaron hembras para verificar la efectividad de la separación según la psn. La psn obtenida con el semen X-putativo fue de 0.385 (n = 39) y la psn al utilizar el semen Y-putativo fue de 0.778 (n = 9). La psn natural (0.52) la determinaron a partir de miles de registros de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA (Argentina). En este estudio la concentración espermática de las dosis de inseminación fue de 30 millones y el porcentaje de preñez a la primera inseminación fue de 68.1% para el semen X-putativo y de 28.9% para el semen Y-putativo. Debido al bajo número de observaciones para los 2 tipos de semen (39 y 9 crías), hicieron una prueba masiva (Fernández *et al.*, 1986b) en la que se obtuvieron 198 crías concluyendo que la probabilidad de error fue de  $P > 0.001$  (no reportan resultados de este segundo estudio).

Aunque la literatura cita trabajos con 76 a 95% de éxito en la separación de espermatozoides X por cromatografía en columnas de sephadex, Beckett *et al.* (1989), no hallaron diferencia significativa alguna en la proporción de espermatozoides X entre el semen tratado y el no tratado. Estos autores sexaron el esperma pre y post-tratamiento por 3 medios: tinción de quinacrina, cariotipo e hibridación del DNA; siendo las dos últimas técnicas muy confiables.

### Centrifugación en gradientes de densidad de Percoll

¿Qué es el Percoll? El Percoll es un gel de sílice modificado cuyas partículas están recubiertas con polivinilpirrolidona (Kaneko *et al.*, 1983; Mc Clure *et al.*, 1989) la cual parece conferirle propiedades inertes por lo que el semen recuperado puede utilizarse sin riesgos de producir reacciones inflamatorias en el tracto reproductor femenino (Pickering *et al.*, 1989). Debido a ser poco viscoso, permite la sedimentación de las células aun a velocidades de centrifugación bajas (300 X g). Además, con el Percoll, se pueden hacer soluciones de densidad de hasta 1.13 g/ml sin el incremento de la presión osmótica (Porter citado por Kaneko *et al.*, 1986). Estas características redundan en un bajo número de células dañadas. La densidad de sedimentación de equilibrio en el esperma humano es de 1.11 a 1.12 (Kaneko *et al.*, citados por Kaneko *et al.*, 1986) y parece ser que es menor la densidad de los Y (Forster *et al.*, 1983).

Al igual que las técnicas anteriormente mencionadas, la centrifugación en gradientes de Percoll fue creada originalmente para mejorar la calidad del semen de pacientes con problemas de fertilidad. El semen obtenido posttratamiento está libre de componentes anormales o irregulares y de linfocitos. Las poblaciones bacterianas disminuyen en forma importante quedando solo cepas no patógenas controlables con bacteriostáticos. También se elimina la mayor parte del plasma seminal. Además, en las fracciones de mayor densidad de Percoll (81-90%) se recupera 22% de la concentración original o 10% de los espermatozoides móviles y con mejor fertilidad que los controles (Forster et al., 1983; Iizuka et al., 1988).

Se piensa que al someter a los espermatozoides a centrifugación, la parte más pesada de los mismos mirara en dirección centrífuga (Khemrev et al., 1988). En un medio con diferentes densidades (de menor a mayor y de arriba abajo) los espermatozoides X sedimentarían más rápido (Kaneko et al., 1987). En el estudio de Kaneko et al. (1987), utilizaron una solución de Nycodez (en la que la sedimentación de los espermatozoides es similar a la que se presenta en soluciones de Percoll) y concluyeron que además de la densidad, ciertas características de superficie (posiblemente cargas eléctricas) influyen también en la velocidad de sedimentación de los espermatozoides. Mediante este método se pretende la obtención de fracciones ricas en espermatozoides X.

En relación al sexado espermático se han hecho pocas investigaciones utilizando este método. Kaneko et al. (1983), trataron semen humano y obtuvieron un 73% de espermatozoides Y-putativos a partir de la capa de menor densidad (1.06 g/ml) y en la fracción más densa (>1.11 g/ml) detectaron un 27.4% de espermatozoides corpusculo-F positivos o, dicho de otra manera, 72.6% de espermatozoides X-putativos. Iizuka et al. (1988), utilizaron 2 técnicas, para mejorar la fertilidad de semen humano: en la primera, con una capa de densidad única, obtuvieron una psn de 0.314 (n = 35); mediante la segunda técnica, en la que utilizaron estratos de diferentes densidades, registraron una psn de 0.30 (n = 10). Uprati (citado por Amann, 1989), no obtuvo resultados positivos. Al evaluar la separación de espermatozoides por citometría de flujo la ps fue de 49:51.

Iwasaki et al. (1988), sexaron por medios citogenéticos a 880 embriones obtenidos a partir de fertilización in vitro con semen separado por el método de Percoll. Concluyeron que esta técnica no sirve para la separación de espermatozoides X e Y de bovino, al menos con el método que ellos utilizaron.

**Técnica.** Los pasos generales de la centrifugación en gradientes de densidad de Percoll son:

- Se prepara una solución madre de Percoll al 90% y a partir de esta se preparan soluciones de diferentes densidades. El número de soluciones (1 a 12) y sus densidades son variables.

- Las densidades de diferentes diluciones de Percoll son: 1.06, 1.07, 1.08, 1.09, 1.10 y 1.11 para las soluciones cuya concentración de Percoll sean 43, 53, 60, 68, 76 y 84%, respectivamente. Se depositan en forma de densidad decreciente en un tubo de centrífuga empezando por la de mayor densidad (figura III.2; Kaneko *et al.*, 1983). La densidad de cada capa se comprueba mediante la centrifugación simultánea de tubos control a los que se añaden marcadores de densidad coloreados junto con las soluciones de Percoll.

- Se centrifuga a 200-600 g por 15 minutos y se recupera las fracciones deseadas, las más densas.

Este método parece tener mucho futuro en el campo de reproducción humana. Ann cuando no sirva para sexar el esperma, se puede emplear para aumentar la fertilidad del semen utilizado en inseminación artificial. Debido a que el entoque en reproducción animal es distinto (los animales de baja fertilidad son indeseables) y a que no se han obtenido resultados favorables en el sexado, parece difícil que este método sea de utilidad en el sector pecuario.

### Citometría y separación de flujo

El desarrollo de esta técnica para el sexado espermático se ha dado enteramente en la década de los 80s. Actualmente la citometría de flujo (CF) ha mostrado ser muy efectiva para evaluar métodos de separación del esperma (Pinkel *et al.*, 1985) y solo en forma muy reciente se han obtenido resultados prácticos prometedores por medio de citometría y separación de flujo (CSF; Johnson *et al.*, 1989; Morell *et al.*, 1988).

La CF se caracteriza por determinar la proporción de DNA celular. Esto se logra midiendo la fluorescencia emitida por el núcleo celular (tenido con algún fluorocromo) después de ser excitado por un rayo láser. La fluorescencia emitida es proporcional a la masa nuclear (Pinkel *et al.*, 1982). En los animales domésticos las diferencias en masa nuclear entre los espermatozoides X e Y son del orden de 3.5 a 4.3% (Pinkel *et al.*, 1982; Garner *et al.*, 1983; Gledhill, 1988).

La separación de los espermatozoides, midiendo estas diferencias, fue lograda primero por Pinkel *et al.* (1982), estudiando al ratón Microtus oregoni (pureza del 80-85%) y

Johnson et al. (1982), en estudios con Chinchilla laniger (pureza de 95%). A decir verdad, en estos estudios se hizo separación de núcleos más que de células debido a que, para una mejor tinción del núcleo, los espermatozoides fueron sometidos a digestión proteolítica la cual provoca descondensación nuclear pero también pérdida de membrana y citoplasma celulares. Por supuesto, estos métodos no permiten la posterior utilización del espermatozoides para la inseminación. Por ello, se modificaron las técnicas de preparación y tinción espermáticas (Johnson et al., 1987b) y se comprobó la capacidad de estos núcleos para descondensarse y formar el pronúcleo masculino después de la fertilización in vitro de ovocitos de hamster desnudos (Johnson y Clarke, 1988). Morell et al. (1988), comprobaron la capacidad fertilizadora de los espermatozoides separados por CSF al inseminar vacas y conejos con semen tratado de las respectivas especies. En este caso, las fracciones enriquecidas en espermatozoides X fueron las únicas que mostraron alguna desviación de la psn. Johnson et al. (1989), separaron espermatozoides intactos mediante un citómetro y separador de flujo modificado (Johnson y Pinkel, 1986). Obtuvieron fracciones con pureza de 86 y 81% para espermatozoides X e Y respectivamente. Utilizaron estas fracciones en inseminación artificial, la psn de las camadas de conejas inseminadas con semen enriquecido en espermatozoides X fue de 94% y la psn de las camadas de conejas inseminadas con el enriquecido en espermatozoides Y fue de 81%. A manera de control, inseminaron otras hembras con el semen resultante de la recombinación de las fracciones X e Y en iguales proporciones, la psn en estos casos fue de 0.47. En la figura 5 se muestra un esquema del citómetro y separador de flujo.

Aunque en los estudios de Morell et al. (1988) o en los de Johnson et al. (1989), los crios nacidos de hembras inseminadas con semen de este tipo no presentaron malformaciones congénitas, es riesgoso conlucarse de que en un futuro estas tinciones nucleares no provocarán mutaciones genéticas bajo un sistema donde sea común la inseminación con semen separado por esta técnica (Morell et al., 1988).

Johnson et al. (1989), señala varias desventajas de esta técnica, y son:

- La cantidad de espermatozoides que pueden ser separados por unidad de tiempo es muy limitada (alrededor de 350,000/hr). Esto elimina las posibilidades de utilizar la CSF para producir semen comercial para la inseminación artificial de especies domésticas.

- Parece haber mayor mortalidad embrionaria al inseminar con semen separado por esta técnica y se cree que se debe a la presencia del fluorocromo en el DNA.

- El costo del aparato es muy alto (250,000 dolares para 1989).

Debido al futuro prometedor de esta técnica en el sexado espermático, en el capítulo 5 se dan en detalle los pormenores de la misma.

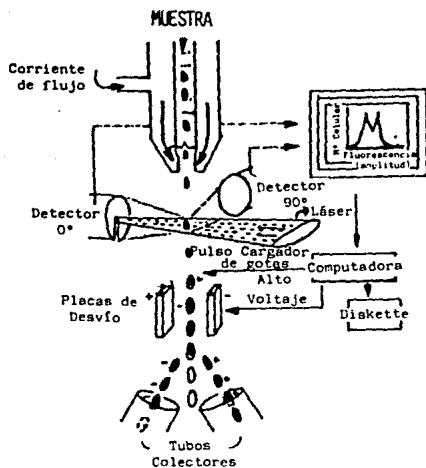


Figura 5. Citómetro y Separador de Flujo. Tomado de Jonnson et al. (1987a).



**CAPITULO IV**

**M E T O D O S   P A R A   S E X A R   E M B R I O N E S**

## MÉTODOS PARA SEXAR EMBRIONES

### 4.1 INTRODUCCION

El sexado embrionario se ha intentado en varias formas como son: análisis citológico del corpúsculo de Barr o identificación de los cromosomas sexuales, cuantificación de diferencias metabólicas, cuantificación de las diferentes tasas de crecimiento, detección de antígenos específicos y la identificación de secuencias génicas específicas.

Antes de entrar de lleno en el terreno del sexaje embrionario, parece pertinente hacer un breve resumen sobre aspectos de anatomía y fisiología del desarrollo del embrión preimplantado, con el fin de recordar términos sencillos no comúnmente manejados. Igualmente se mencionaran algunos parámetros sobre transplante embrionario y métodos complementarios que lo enriquecen. De esta manera, queda sentada una base sobre la cual poder entender y evaluar más fielmente los resultados que se han obtenido mediante las técnicas para sexar embriones.

#### Generalidades sobre anatomía y fisiología (expresión génica) del embrión.

Los términos que se utilizan para describir las diferentes etapas de desarrollo del embrión se basan en datos morfológicos principalmente. A continuación se describe el desarrollo del embrión bovino y en el cuadro IV.1 se compara con el desarrollo embrionario en otras especies. Las primeras etapas se clasifican según el número celular, así se dice que el embrión es de una célula (con pronucleos masculino y femenino) y hasta 16 células. A partir de esta etapa se le da el nombre de morula por semejar un racimo de uvas. El contorno blastomérico es delineable hasta que alcanzan un número aproximado de 32 células momento en el que se da la compactación, la cual antecede a la formación de una cavidad (blastocela) inicio de la etapa de blastocisto (Betteridge y Flechon, 1988). La etapa de blastocisto se divide en temprano, medio y tardío (100 a 140 células aproximadamente), blastocisto en eclosión (momento en el que deseca la zona pelúcida: 200 células aprox.) y blastocisto en elongación (1000 células aprox.), después de lo cual sigue la implantación o fijación (Betteridge y Flechon, 1988; Skrzyszowska y Smorag, 1989). En la figura 6. se muestran esquemas de la morfología y número celular embrionarios en sus diferentes etapas.

La fisiología del embrión va cambiando según su desarrollo. En las primeras divisiones la maquinaria metabólica es casi por completo de origen materno (Betteridge y Flechon, 1988). En el ratón una buena parte del RNAm materno está disponible para la traducción en la etapa de blastocisto, este material fue incorporado durante la ovogénesis (Harez, 1989). Si se cultiva a los embriones en un medio con Actinomomicina D (inhibidor de transcripción, síntesis de RNA), no se bloquea la segmentación, pero si al medio de cultivo se le añade puromicina (inhibidor de la síntesis proteica, traducción) no hay segmentación (Balinsky, 1982). La producción de RNA heterogéneo nuclear (RNAn) y de RNAr se da en la etapa de 2 células en ratones y cabras, 4 células en puercos y humanos, 8 células en novinos y 16 células en ovinos. Los requerimientos metabólicos también varían, por ejemplo, cuando el sustrato principal es la glucosa, los embriones novinos de 10 células continúan su desarrollo a diferencia de los embriones de 16 células. Es importante considerar esto para la elaboración de los medios de cultivo (Betteridge y Flechon, 1988).

Cuadro II. "Anatomía" del embrión (preimplantación) en diferentes especies.

	Premórula*	Mórula**	Blastocisto			Especie
			temprano	tardío	elongado	
# celular	1-16	16-32	100	140 115	1000	bovino ovino ratón humano
	1-12	8-16 12-60	40 60	72		
Edad del embrión (días post estro)***	0-4 0-3 0-3 0-2 0-2 0-3	3-6 3-5 3-5 3 3-4 3-6	7-9 4-6 4-6 4 4-5 5-8	8-12 5-7 5-7 4 5-6 8-10	13 11 11	bovino equino suiño conejo humano ovino
Entrada al útero (días post estro)****	3-3 1/2 2 2	4-5				bovino equino suiño conejo

\* Premórula, del día 0 hasta el inicio de la mórula.

\*\* Mórula, incluye mórula temprana y mórula compacta.

\*\*\* Día 0 = día del estro.

\*\*\*\* La entrada al útero varía en los animales superovulados. Al menos en la vaca en la que este se adelanta 1 día o más con respecto a los no superovulados (Hawk et al., 1989).

Adaptado de Avery y Shmidt (1989), Harez (1989) y Mc Donald y Pineda (1989).

### Transferencia embrionaria y técnicas complementarias

Para la transferencia embrionaria se conjuntan un gran número de técnicas y varias de ellas sirven para mejorar su eficiencia. Algunos de los factores que afectan esta eficiencia y que tienen que ver con métodos que se mencionan posteriormente, son: calidad del embrión, etapa de desarrollo del embrión, método de seccionamiento, número de demi-embryos transferidos, etc.

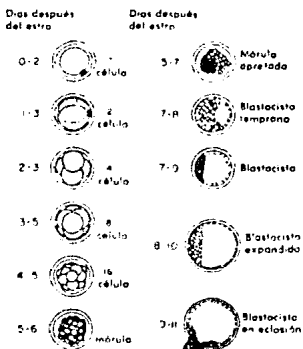


Figura 6. Las diferentes etapas embrionarias y su número celular (bovino). Tomado de Hafez (1989).

El parámetro que se utilizara como base de comparación para los resultados reportados en los trabajos de sexado embrionario, es aquél que se obtiene mediante una técnica de transferencia embrionaria tradicional (Figura 7) en la que se transfieren embriones completos, con zona pelúcida (ZP) intacta, en etapa de mórula o blastocisto temprano y transferidos en fresco por la técnica no quirúrgica. En bovinos el índice de preñez en la transferencia embrionaria no quirúrgica debe oscilar entre 50 y 65%. Aunque la técnica quirúrgica presenta mejores índices de preñez (75-80%; Henschen, 1988), no se considera como parámetro base ya que la mayoría de los trabajos a los que se hace referencia en esta revisión, utilizaron la técnica de transferencia no quirúrgica. También en pequeños rumiantes parece haber mejores índices de preñez con embriones transferidos quirúrgicamente (40-75%) que con los transferidos no quirúrgicamente (40%; Kraemer, 1989).

Otras variables que se consideran importantes en la transferencia embrionaria son:

- La cantidad de embriones recolectados mediante superovulación. El número de embriones obtenidos por el método de superovulación varía según la técnica, la especie y la donadora. Driancourt *et al.* (1988), obtuvieron un promedio de 6 embriones viables por hembra en ovinos. Avery *et al.* (1989a),

recolectaron un promedio de 5 embriones de 6-7 días de 186 vacas donadoras.

- La viabilidad de los ovocitos. La viabilidad de los ovocitos superovulados es menor que en los ovocitos ovulados espontáneamente. En las especies domésticas las anomalías cromosómicas se dan en baja proporción en ovulaciones naturales (Roberts *et al.*, 1990), pero más de la mitad de los embriones obtenidos a partir de vacas superovuladas se desarrollan anormalmente (King, 1985). Por ejemplo, en ovinos, el índice de anomalías cromosómicas en embriones obtenidos a partir de ovocitos superovulados es del 17% vs 1% cuando se fertilizaron ovocitos ovulados naturalmente (King, 1985). En bovinos, el 19% de los embriones obtenidos de ovocitos superovulados presentan anomalías cromosómicas (Betteridge y Flechon, 1988).

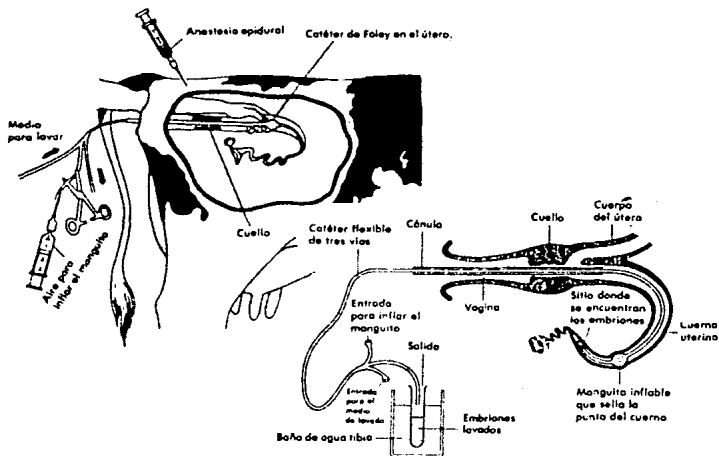


Figura 7. Técnica de transferencia embrionaria por el método no quirúrgico. Tomado de Hartz (1989).

- Sincronización entre donadora y receptora. Es muy importante la sincronización de la fase del ciclo sexual entre donadoras y receptoras. Lo máximo que se puede tolerar de asincronía entre donadora y receptora es de 48 hrs (Roberts *et al.*, 1990). En general los embriones transferidos a receptoras en etapas uterinas menos avanzadas son tolerados mejor que a la

inversa (Roberts *et al.*, 1990). Recientemente se le ha dado más importancia a la sincronía entre la etapa de desarrollo del embrión y la fase sexual de la receptora (Aspron, comunicación personal). Pensando en embriones criopreservados (durante el tiempo que sea) este segundo criterio parece ser más lógico.

- Edad del embrión. Hay evidencias de que embriones en etapa de mórula o blastocisto temprano (6-8 días) son los más viables para la transferencia (Singh y Hare, 1980; Moustafa, 1980).

- Reconocimiento materno de la preñez. El reconocimiento materno de la preñez se da a los 12-13 días en ovejas y 15-16 días en vacas (Roberts *et al.*, 1990) por lo que es imperativo que la transferencia se lleve a cabo en etapas previas.

- Embriones frescos vs. embriones congelados. Los embriones se pueden transferir en fresco o post congelación-descongelación. En general se obtiene mejor índice de preñez en la transferencia con embriones en fresco (Britt, 1988; Rowe, 1986). Pero conforme se perfeccionan los métodos de congelación esta diferencia se reduce (12% en 1985 vs 7% en 1987; Gray, 1988).

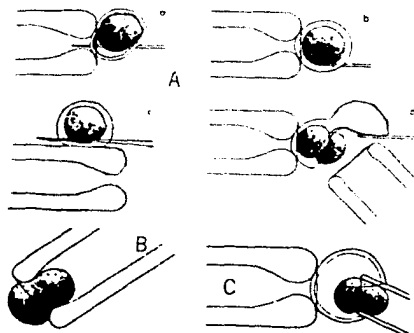


Figura 8. Seccionamiento embrionario. A) Ruptura de la zona pelúcida (ZP) y seccionamiento del embrión con micro-aguja de vidrio. B) y C) separación de blastómeros e introducción de uno de ellos en una nueva ZP. Tomado de Harez (1989).

#### Técnicas complementarias en la transferencia embrionaria.

**Seccionamiento embrionario.** Una de las técnicas complementarias en la transferencia embrionaria es la disección de los embriones. Esta es muy importante ya que de esta manera se puede obtener un

mayor número de embriones por hembra. Además, por ser gemelos idénticos y, por tanto, en los que prácticamente se ha eliminado la variabilidad genética, son muy útiles para la investigación (Nagashima *et al.*, 1989). El seccionamiento embrionario se puede realizar con hoja metálica o con microagujas (Snelton y Szell, 1988) como se muestra en la figura 8. La adhesión entre blastómeros parece ser en parte calcio dependiente (Betteridge y Fiechon, 1988) por lo que se facilita y mejora la separación de blastómeros en un medio libre de cationes  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  (Skrzysowska y Smorag, 1989). La efectividad de la transferencia de embriones disectados va del 16 al 60%. Los embriones en etapas más avanzadas resisten mejor la manipulación. Durante este proceso existe pérdida celular, 13-17% en etapa de blastocisto tardío (Skrzysowska y Smorag, 1989).

Los demi-embryos (porciones de embrión resultantes del seccionamiento) transferidos muestran ser menos viables que los embriones intactos postdescongelación (Picard *et al.*, 1985).

Zona pelúcida (ZP). El embrión está recubierto por una membrana (Zona pelúcida) que, entre otras cosas, le sirve de protección contra la infección por microorganismos (Aspron, comunicación personal). Son contradictorias las investigaciones sobre la dispensabilidad (Nagashima *et al.*, 1989; Seike *et al.*, 1989; Williams y Moore, 1986) o no dispensabilidad (Picard *et al.*, 1985; Snelton y Szell, 1988) de la ZP. Es más, algunos autores obtuvieron mejores resultados al transferir demi-embryos sin ZP que con ella; esto lo achacan a un menor manejo de los embriones que no se reintroducen en ZP (Seike *et al.*, 1989). Parece haber mayor uniformidad de criterios en cuanto a que la ZP es necesaria para la supervivencia de embriones en etapas de morula y anteriores (Betteridge y Fiechon, 1988; Nagashima *et al.*, 1989; Seike *et al.*, 1989; Snelton y Szell, 1988; Williams y Moore, 1986).

Otras técnicas. El trasplante de núcleos (Robi y Stice, 1989); Smith y Wilmut, 1990) y la transferencia de genes (Hawk *et al.*, 1989; Wilmut *et al.*, 1990) son técnicas cuyo auge está creciendo rápidamente que, junto a los métodos anteriores, incrementan las posibilidades reproductivas y productivas en la ciencia animal.

Se concluyen esta introducción con las siguientes aseveraciones de King (1985).

- Siempre habrá cierto nivel de pérdida embrionaria sin importar las condiciones.

- Entre más manejo de los embriones se realice, mayor será la pérdida.

- Siempre aumenta el índice de preñez al mejorar la práctica de cualquiera de las técnicas. Según Rowe (1986), se necesitan realizar alrededor de 500 transferencias para considerar habil a un técnico en este procedimiento.

#### 4.2 ENZIMAS LIGADOS AL CROMOSOMA X

Los mamíferos hembras tienen cromosomas sexuales homólogos XX. Parte de los genes que contienen son exclusivos (genes ligados al cromosoma X), otros genes los comparten con el cromosoma Y de machos (Simmier *et al.*, 1985) y otros tantos los comparten con autosomas (Alberfs *et al.*, 1987; Bondioli *et al.*, 1989). De los genes "exclusivos del cromosoma X" se dice que las hembras tienen el doble que los machos. Por tanto, si la expresión de estos genes fuera constante, cabría esperar también doble actividad de ciertos enzimas codificados por este cromosoma en células XX con respecto a células XY. Para compensar esta desigualdad, uno de los cromosomas X está inactivo en las células somáticas (en mamíferos de sexo femenino: Kratzer y Gartler, 1978). Ahora bien, durante la ovogénesis y durante el crecimiento del ovocito, ambos cromosomas X están activos (Epstein, 1972). En cambio durante la espermatogénesis el cromosoma X del macho parece estar inactivo (al menos parcialmente; Jablonka y Lamp, 1988; Lifsnytz y Lindsley, 1972). Después de la fertilización persiste la inactivación de alguno de los cromosomas X pero al llegar a la etapa de 8-16 células todo parece indicar que ambos cromosomas X (el materno y el paterno) están activos en los embriones hembra en el bovino y en el ratón posiblemente desde la etapa de 2 células en la que empieza la expresión génica (Hatez, 1989; Hetheridge y Flacnon, 1988); por lo que, cuantitativamente hablando, en esta etapa del desarrollo son bioquímicamente y, tal vez, fisiológicamente diferentes de los embriones machos (Epstein *et al.*, 1978). La actividad enzimática descompensada persiste durante la etapa de morula y blastocisto temprano y posiblemente en células de la masa celular interna durante el blastocisto tardío (Lyon, citado por Epstein *et al.*, 1978).

La medición de la actividad enzimática ha sido propuesta para sexar embriones en base a las diferencias señaladas anteriormente. Las enzimas ligadas al cromosoma X cuya actividad se ha evaluado con este fin son: Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT; Epstein *et al.*, 1978; Kratzer y Gartler, 1978; Monk y Kathuria, 1977; Monk y Handyside, 1988); alfa-galactosidasa (alfa-gal; Adler, 1977) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD; Rieger, 1984; Tiffin *et al.*, 1990; Williams, 1986).

En la mayoría de estos casos se observó una distribución bimodal en la actividad enzimática de los embriones sugiriendo que cada población corresponde a uno de los sexos.



### Hipopoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT).

Epstein *et al.* (1978) dividieron embriones en la etapa de blastocisto temprano con el objeto de utilizar una de esas mitades (demi-embryo) para sexaria mediante análisis cromosómico, mientras que la otra mitad se utilizó para medir la actividad enzimática de la HGPRT. En 3 experimentos, los demi-embryos considerados hembras al análisis cromosómico mostraron una actividad 1.87, 2.42 y 2.17 veces mayor con respecto a los embriones macho. Para descartar que esta distribución bimodal se debiera a causas circunstanciales más que a diferencias reales entre dos poblaciones de embriones se evaluó también la actividad del enzima adenina fosforribosil transferasa (APRT) codificada por genes autosómicos (Epstein, 1978; Monk y Handyside, 1988), de esta manera se pueden evaluar también las variaciones individuales en el metabolismo embrionario (van Vliet *et al.*, 1989). Para la enzima HGPRT se observó distribución bimodal siendo cerca de 2 veces mayor la actividad en embriones hembras que en machos, en cambio, para la APRT no se observó dicha distribución registrándose una proporción en la actividad hembra/macho de 1.19 (Epstein *et al.*, 1978). En apoyo a estas observaciones se tiene que la distribución de la actividad de la enzima HGPRT es unimodal en embriones menos desarrollados de 8 células o más desarrollados de blastocisto tardío, etapas en las que uno de los cromosomas X está inactivo (fig. 9).

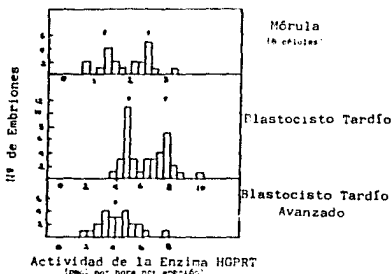


Figura 9. Medición de la actividad de la HPRT en embriones de diferentes edades. Tomado de Kratzer y Gartier (1978).

En la figura 9, se muestra la distribución de la actividad de la enzima HGPRT en 3 etapas del desarrollo embrionario. La distribución de la actividad enzimática es claramente bimodal en la etapa de 8-32 células, pero para la etapa de blastocisto tardío avanzado no es evidente, de hecho, muestra distribución unimodal (Kratzer y Gartier, 1978).

Monk y Handyside (1988), sexaron correctamente 14 (93%) de 15 embriones de ratón midiendo la actividad de esta enzima. Estos autores obtuvieron blastómeros "sencillos", mediante pipeteo, de embriones en etapa de 8 células. A los blastómeros sencillos se les practicó el sexaje y el resto de cada embrión (7 células) se utilizó en la transferencia embrionaria. En otros estudios transfirieron 47 embriones de ratón, 21 sexados y 26 controles, con el objeto de ver si disminuía la viabilidad embrionaria por el manejo a la diopsia. El índice de preñez fue del 71 y el 73%, respectivamente (sin diferencia estadística). Por este medio, el diagnóstico del sexo embrionario fue eficiente y rápido permitiendo la transferencia embrionaria sin la necesidad de criopreservación previa.

#### Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD).

La enzima G6PD interviene en el metabolismo de la glucosa, cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato a fosfogluconato en la cual se libera el  $\text{CO}_2$  como  $\text{CO}_2$  (Rieger, 1984); en esta reacción, interviene la coenzima nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADP) liberándose como  $\text{NADPH}^+$  (Williams, 1986). Rieger (1984), propone que mediante la medición del  $\text{CO}_2$  metabólico se pueden distinguir embriones hembra de embriones macho ya que los primeros deberían liberar el doble de este metabolito comparados con los segundos.

Williams (1986), evaluó la actividad de la G6PD en embriones de ratón obtenidos 4 días post-apareamiento, utilizó un método colorimétrico siendo el sustrato el azul brillante de cresilo. Este sustrato pierde color al ser reducido por la NADPH, de esta manera se puede evaluar semicuantitativamente los niveles de G6PD. Al medir la coloración de los embriones al microscopio los clasificó en 6 grupos (del 0 al 5) "arbitrariamente". A los 3 grupos más coloreados (3, 4 y 5 con bajos niveles de G6PD) los clasificó como formados por embriones del sexo masculino y a los 3 grupos menos coloreados (0, 1 y 2 con altos niveles de G6PD) como formados por embriones del sexo femenino. Se transfirieron 516 embriones de los cuales nacieron 181 (34%) y de estos el 54% fue sexado correctamente. Si bien este resultado se ve poco alentador, tomando en cuenta grupos por separado, la eficiencia en la predicción del sexo fue mayor para los grupos situados hacia los extremos (0 y 5) cuya actividad de G6PD se consideró muy alta o muy baja, respectivamente. La eficiencia en el sexado para estos grupos fue de 81% ( $n = 16$ , grupo 0) y 100% ( $n = 3$ , grupo 5) pero por desgracia estos grupos también mostraron la mayor reducción en viabilidad atribuida a toxicidad de la prueba. Este problema puede ser evitado si se practica una diopsia al embrión obteniendo de preferencia sólo un blastómero (Monk y Handyside, 1988) al cual se le sexa mientras que el resto del embrión se utiliza para la transferencia.

Tiffin et al. (1990), mediante un método similar concluyeron que la actividad relativa de esta enzima (G6PD) en la vía pentosa fosfato no sirvió para diagnosticar el sexo en embriones bovinos de 7 días.

#### Alfa galactosidasa (alfa-gal).

En el estudio de Adler *et al.* (1977), el incremento (hasta de 300 veces) en la actividad de esta enzima coincidió con el incremento de la actividad de la HPRT. Esta alza de actividad tan evidente sugiere que ambos cromosomas X se expresan en embriones de ratón a partir de la etapa de 4 células y hasta antes de la implantación.

Una ventaja del sexar los embriones midiendo la actividad enzimática es que permite a la vez evaluar la viabilidad de los embriones ya que la actividad de cualquier enzima es reflejo de la actividad celular total (Rieger, 1984).

Los errores y/o desventajas en el diagnóstico del sexo embrionario mediante la medición de la actividad enzimática se pueden deber a:

1) Diferencias "idiosincráticas" en la actividad enzimática de cada embrión (Epstein *et al.*, 1978; Monk y Handyside, 1988; van Vliet *et al.*, 1989).

2) No se conoce el momento exacto de la activación e inactivación del cromosoma X en hembras (Epstein *et al.*, 1978; Harez, 1987; van Vliet *et al.*, 1989).

3) Presencia de rNAm de origen materno. Una cantidad importante del rNAm de origen materno, incorporado durante la ovogénesis, está disponible para la traducción en la etapa de blastocisto (Harez, 1989; van Vliet *et al.*, 1989).

4) Efectos tóxicos de algunos de los reactivos o de los metabolitos resultantes, disminuyendo la viabilidad de los embriones (van Vliet *et al.*, 1989; Williams, 1986).

Las desventajas 1, 2 y 3 pueden llevar fácilmente a dar falsos sexajes sobre todo en las zonas coincidentes de actividad enzimática. El efecto tóxico carece de relevancia si la técnica se realiza sobre biopsias embrionarias.

La investigación en esta área no ha gozado de popularidad por lo que con tan pocos intentos no sería justo descartarla como una posibilidad de importancia, seguramente con el perfeccionamiento de estas técnicas, algunas o todas las desventajas podrán ser superadas haciendo muy atractiva esta metodología en el sexado embrionario.

#### 4.3 SEXAJE EMBRIONARIO MEDIANTE TECNICAS INMUNOLOGICAS (deteccion del antigeno H-Y)

¿Que es el antigeno H-Y y cual es su funcion?

Historicamente hablando, se sospecho de la existencia del antigeno H-Y por primera vez gracias a los estudios de transplante de piel en lineas de ratones y ratas altamente consanguineas. En 1955, Eicwald y Sillmer (citados por Wachtel, 1984), observaron que las nembras de la cepa C57BL/6 (B6) de raton rechazaban los transplantes de piel provenientes de machos y, en cambio, cuando el transplante lo realizaron entre nembras, entre machos o de hembra a macho de la misma cepa, no hubo tal rechazo. Se postulo que el rechazo se debia a la presencia del antigeno H-Y (histocompatibilidad-Y) presente en los tejidos de los machos pero no de las nembras y a que estas lo detectan como extraño creando respuesta inmune contra el mismo. Este principio es en el que se basa la produccion de suero anti H-Y para la deteccion de celulas con "fenotipo macho", en el caso que nos ocupa, embriones XY (Anderson, 1987; Wachtel, 1984). Debido a que el antigeno H-Y se detectó en las pruebas de transplantes de piel, mencionadas arriba, se le conoce como antigeno de transplante (detectado por inmunidad celular, mediada por linfocitos T). También se ha detectado un antigeno por inmunidad humoral (mediada por linfocitos B) y se le ha llamado antigeno masculino detectado seriológicamente (SDM por sus siglas en inglés). A decir verdad, el rechazo de injertos se da tanto por inmunidad celular como por inmunidad humoral (Villa et al., 1988). Actualmente existe controversia sobre si son dos antigenos diferentes o si es el mismo (Kooman et al., 1989; Cattanaeh, 1987) pero, lo que si se conoce, es que comparten antigenicidad cruzada alta (Anderson, 1987; Booman et al., 1989; Wachtel, 1984).

Filogeneticamente hablando, se dice que este antigeno ha sido altamente conservado, de tal manera que puede ser detectado en los animales de sexo heterogamético de prácticamente todas las especies (Avery et al., 1989b; Wachtel, 1975a). Entre los mamíferos ha sido detectado en los machos bovinos, caninos, caprinos, equinos, el humano y el cerdo, entre otros; en aves, está presente en las nembras ya que estas son el sexo heterocigótico ZW y a su antigeno se le conoce como H-W, el cual presenta antigenicidad cruzada con el H-Y (Wachtel, 1984).

Esta persistencia a través de la evolución sugiere un rol vital de este antigeno en la conservacion de las especies (Wachtel, 1975a) y es propuesto como el inductor primario de la diferenciación sexual de la gonada (testicular en mamíferos y ovarica en aves) apoyándose en la hipótesis de que el antigeno

H-Y es producto del gen codificante del factor de determinación testicular (TDF, por sus siglas en inglés; Wachtel, 1975b). En acuerdo con esta hipótesis están los estudios en los que células ováricas de la rata fueron inducidas a organizar estructuras testiculares (v. gr., túbulos seminíferos) al ser expuestas al antígeno H-Y, efecto que se ve bloqueado al anadir anticuerpos monoclonales dirigidos contra ese antígeno (Miller y Urban citados por Wachtel, 1984).

Por el contrario, McLaren et al. (1984), reporta la diferenciación sexual masculina de ratones que carecen del antígeno H-Y y, Burgoyne et al. (1986), señalan talía en la espermatogénesis de estos ratones. Burgoyne (1988), reporta que las células de Sertoli (indispensables en la espermatogénesis) siempre presentan cromosomas sexuales XY en quimeras de ratones XX-XY a diferencia de otros tipos celulares del testículo como las células de Leydig en las que hay tanto clones celulares XX como clones de células XY. Simpson et al. (1987), detectaron por técnicas de hibridación del DNA, que el gene que codifica para el antígeno H-Y y el que codifica para TDF son distintos y se localizan en porciones diferentes del cromosoma Y, al menos en el humano. Esto sugiere que el antígeno H-Y es consecuencia y no causa primaria de la diferenciación sexual, siendo importante, tal vez, sólo para etapas posteriores de la misma.

Ahora bien, lo que sí es seguro y de interés para el sexaje de embriones, es la amplia difusión de este antígeno en el reino animal. Esto permite utilizar anticuerpos de rata o ratón para identificar células XY de otras especies (Wachtel, 1984).

#### Detección del antígeno H-Y en embriones

Existen múltiples ejemplos de las variaciones en la expresión génica entre tipos celulares y en las diferentes etapas cronológicas y fisiológicas en un mismo tipo celular. La expresión de antígenos de superficie (Villa et al., 1988), en este caso en embriones, no es la excepción. La maduración y diferenciación del blastocisto resulta en cambios en la superficie trofodérmica alterándose, entre otras cosas, la expresión de antígenos tisulares (Betteridge y Flécon, 1988). Para el antígeno H-Y se ha determinado que la mejor etapa para detectarlo por métodos serológicos es a partir de la fase de 8 células y hasta el blastocisto temprano siendo prácticamente nula su detección en etapas previas y, aunque todavía se expresa en etapa de blastocisto tardío, es menos eficiente su detección (Kroo y Goldberg, 1976; White et al., 1983; White et al., 1987). En la fase de blastocisto en expansión el antígeno H-Y ha sido detectado en la masa celular interna pero no en el trofoblasto. Se piensa que es un mecanismo de autorregulación del embrión para evitar que la madre que lo gesta, lo reconozca por ser el análogo de un injerto (White et al., 1987).

Técnicas citotóxicas. Los primeros métodos de detección del antígeno H-Y en embriones se pasaban en pruebas citotóxicas (Krcó y Goldberg, 1976). En estas pruebas se cultivan embriones en la etapa de mórula o blastula en un medio al que se le ha añadido suero anti H-Y. Después de algunos lavados (para eliminar los anticuerpos que no se hallan fijado a los embriones) se le añade complemento de cuyo. Así, las células que fijan anticuerpos anti H-Y por presentar este antígeno en su superficie, serán lisadas por el complemento. Este método demostró que aproximadamente el 50% de los embriones fueron lisados lo que sugería que los embriones no afectados eran XX. Epstein et al. (citados por Wacntel, 1984), confirmaron las sospechas de Krcó y Goldberg al registrar un 92% de embriones nembra después de realizarles el cariotipo a los embriones no afectados sometidos a una prueba similar a la anterior. Igualmente se demostró la certeza de esta hipótesis al transplantar embriones de ratón no afectados (52%) a nembras pseudoprenadas. De un total de 1000 embriones tratados sobrevivieron al trasplante 58 y de estos el 86% eran nembras (White et al., 1983).

Técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Debido a que la metodología citotóxica elimina selectivamente a los embriones XY, se modificó utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) prescindiendo del complemento de tal manera que no sea afectado tipo celular alguno. De esta manera, puedan ser transplantados, posteriormente a su identificación y separación, tanto embriones XX (por lo general H-Y negativos) como los XY (por lo general H-Y positivos), evitando así el desperdicio de material biológico (White et al., 1983). Esta técnica se basa en la utilización de un segundo anticuerpo marcado con alguna sustancia fluorescente, generalmente isotiocianato de fluoresceína (ITC-F) o isotiocianato de rodamina (ITC-R), que va dirigido contra los anticuerpos del antisuero H-Y. Este segundo anticuerpo se obtiene de la inmunización de conejos (Iyer et al., 1989), cabras (White et al., 1987), o algún otro animal diferente del ratón, con IgG de origen murino. De esta manera, primero se cultivan los embriones en un medio con antisuero H-Y, se hace un lavado, se cultivan en un medio con anticuerpo marcado con ITC-F el cual se une específicamente al primer anticuerpo, se lavan nuevamente y por medio del microscopio de fluorescencia se detectan los embriones H-Y + (machos) y los H-Y - (nembras) para su separación.

La aparición de los anticuerpos monoclonales han sido de gran importancia para las pruebas serológicas ya que aumentan su especificidad a tal grado que no solo se puede distinguir entre tipos celulares diferentes, sino que también son identificables las etapas de diferenciación en un mismo tipo celular (Villa et al., 1988). Booman (1988), reporta el sexado de embriones novinos de 8-7 días utilizando anticuerpos monoclonales en la técnica de IFI. En este estudio clasificaron a los embriones en 3 categorías: fluorescentes (35%), no fluorescentes (40%) e intermedios (fluorescencia pobre, 25%). Por medio del cariotipo se determinó el sexo de estos embriones. El 100% de los embriones

de fluorescencia determinable (primeras 2 categorías) fue sexado correctamente como machos y hembras, respectivamente. En los embriones clasificados como de fluorescencia intermedia el sexado fue incierto.

Cuadro III. El antígeno H-Y en el sexado de embriones de ratón.

Cepa	Etapas	Tratamiento	Resultado
C57BL/6	4, 8 y 16 células	Citotoxicidad	50% de 11s1s
ICR	8 células	Citotoxicidad Cariotipo	50% 11s1s 92% hembras
C57BL x A	4, 8 células	Citotoxicidad Implantación	87% hembras
CD1	4, 8 células	Citotoxicidad Cariotipo	52% hembras
Varias cepas	8, 16 células	Citotoxicidad	86% hembras
NR	8, 16 células	Citotoxicidad Implantación	46% 11s1s 81% hembras
NR	Morula, diastocisto	Fluorescencia Implantación	55% marcados 78% machos

NR = no reportado.  
(Tomado de Wachtei, 1984).

Wachtei *et al.* (1988), sexaron correctamente del 73 a 82% de embriones bovinos de 6 a 7 días por la técnica de IFI con anticuerpos monoclonales. Utilizaron como marcador fluorescente el compuesto biotina-streptavidina y detectaron los embriones fluorescentes por medio de citometría de flujo (pag. 97). En este experimento el índice de preñez fue alto (74%) y seguramente se debió en parte a que transplantaron de 2 a 4 embriones por receptora. La técnica duró apenas 2-3 horas lo que es compatible con la transferencia de embriones en fresco. Ninguno de los crios resultantes de este estudio presentó anomalías aparentes. Estos autores resumen también estudios realizados en 1985 y 1987 en los que de 86 embriones sexados por medios inmunológicos, el 75% fue sexado correctamente.

En equinos, Wood *et al.* (1984), sexaron correctamente mediante la técnica de IFI al 91 y al 75% de embriones fluorescentes y no fluorescentes, respectivamente.

Relación entre velocidad de crecimiento y cultivo en suero anti H-Y, con el sexo del embrión. Se ha visto que los embriones presentan diferente tasa de desarrollo. Avery et al. (1989a, b) clasificaron a los embriones en 3 categorías según la tasa de desarrollo que presentaron. Reportan que, al cariotipo, los embriones fueron 78% machos en el grupo de desarrollo rápido, y 73% y 89% de hembras en los grupos de desarrollo intermedio y lento, respectivamente. Utsumi et al. (citados por Avery y Schmidt, 1989), al incubar en un medio con antisuero H-Y a embriones de cabra y de vaca en las etapas de morula compacta y diastocisto temprano, encontraron una especie de arresto del desarrollo en algunos de los embriones. De los embriones que continuaron su desarrollo (diastocistos) y que fueron transferidos, el 80% resultaron hembras. Con este mismo criterio, Avery et al. (1989b), incubaron embriones de 6-7 días en antisuero H-Y a base de anticuerpos monoclonales. Los sexaron por medios citogenéticos y el 68% de los que continuaron su desarrollo fueron XX, en cambio los de desarrollo arrestado (morula compacta) el 100% resultó XY. La desventaja de este estudio es que los embriones deben ser cultivados por varias horas (10-20) por lo que disminuye la viabilidad de los mismos (de 6 embriones transferidos nació solamente una cría).

Otros métodos inmunológicos utilizados para la detección del antígeno H-Y son el radioinmunoensayo (RIA; Meck y Goldberg, 1984) y el enzimoimmunoensayo (ELISA; Koeman et al., 1989).

Es importante observar que para la realización de cualquiera de estas técnicas, los embriones deben estar desnudos, es decir, sin zona pelucida. Esto es con el fin de que los antígenos queden accesibles a los anticuerpos y también para evitar que estos últimos se unan a los embriones en forma inespecífica.

#### Producción de suero hiperinmune anti H-Y

La producción de antisuero H-Y se basa en la estimulación del sistema inmune de hembras (principalmente ratones, ratas o conejos), con células que expresen este antígeno, por alguno de los siguientes medios:

a) Transplante repetido de tejidos. Goldberg et al. (1971), obtuvieron el antisuero H-Y de la sangre de hembras 5-14 días después del cuarto o quinto recnazo de injerto de piel de macho a hembra de la cepa B6 de ratones. Este método, a diferencia de los siguientes, se basa en la estimulación de la inmunidad celular. Bradley y Heslop (citados por Bradley et al., 1987), modificaron esta técnica al hacer una implantación intraesplénica de células singénicas (células provenientes de animales de la misma cepa teniendo esta como característica una alta consanguinidad) de piel obteniendo una respuesta más rápida y pasajera.



b) Inmunización con células de macho. Las células utilizadas en la inmunización se obtienen mediante la suspensión de las mismas en suero tampon fosfatado (PBS, por sus siglas en inglés) a las que se añade algún adyuvante. Las células empleadas más comúnmente son las obtenidas del bazo de algún macho que corresponda a la misma cepa que las hembras utilizadas como productoras del antisuero. En el esquema de inmunización es importante tanto la concentración celular como el calendario de inmunizaciones. Piedranita y Anderson (1985), utilizando diferentes esquemas de inmunización encontraron que si se inyecta una dosis de 100 millones de células 3 veces a la semana durante 3 semanas, la producción de antisuero es bajísima o nula y se sospecha que se debe a un fenómeno de tolerancia de zona alta. Parece ser que la dosis celular más efectiva va de 25 a 50 millones de células 1 vez a la semana por 3 semanas seguidas de aplicaciones de refuerzo cada 2 semanas (Piedranita y Anderson, 1985; White et al., 1987).

Otros tipos celulares utilizados para la inmunización son: células espermáticas, células epiteliales, timocitos, etc. También se pueden emplear células de otra especie como los espermatozoides de humano (Hinrichsen-Kohane et al., 1985).

Para cualquier tipo celular utilizado en las inmunizaciones, es importante hacer una serie de lavados (2-3) de la suspensión celular con objeto de eliminar tejido conectivo o plasma seminal (cuando se empleen células espermáticas como inmunógenos); lavados que se intercalan con procesos de centrifugación para aumentar la pureza y concentración celulares.

b.1) Producción de anticuerpos monoclonales anti H-Y. El esquema de hiperinmunización para producir anticuerpos monoclonales es más prolongado (9-20 semanas) que el mencionado arriba. Además, aproximadamente 3 días antes de la fusión, se aplica un "refuerzo" de 50 millones de células por vía intravenosa. Después de el esquema de hiperinmunización, se fusionan células esplénicas provenientes de las hembras hiperinmunizadas, con células de mieloma. De tal suerte que resultan un gran número (inclusivo miles) de clonas productoras de anticuerpos. Posteriormente se investiga mediante pruebas como IFI, ELISA, etc., cuales de las clonas producen anticuerpo anti H-Y y de estas se obtienen las que los producen en forma más pura (Booman et al., 1989; Hinrichsen-Kohane et al., 1985; Meck y Goldberg, 1984; Wächter et al., 1988).

## Problemas en la producción de antisuero

Por desgracia la respuesta a las inmunizaciones contra el antígeno H-Y es generalmente pobre (Anderson, 1987; Curichron y Steel, 1985; Piedranita y Anderson, 1985). Esto se debe a:

a) baja antigenicidad de esta molécula y baja densidad de la misma en la membrana celular (Koo, 1981).

b) Variabilidad de respuesta a las inmunizaciones entre los diferentes animales (principalmente ratones) utilizados para la producción de este antisuero (Piedranita y Anderson, 1985; White

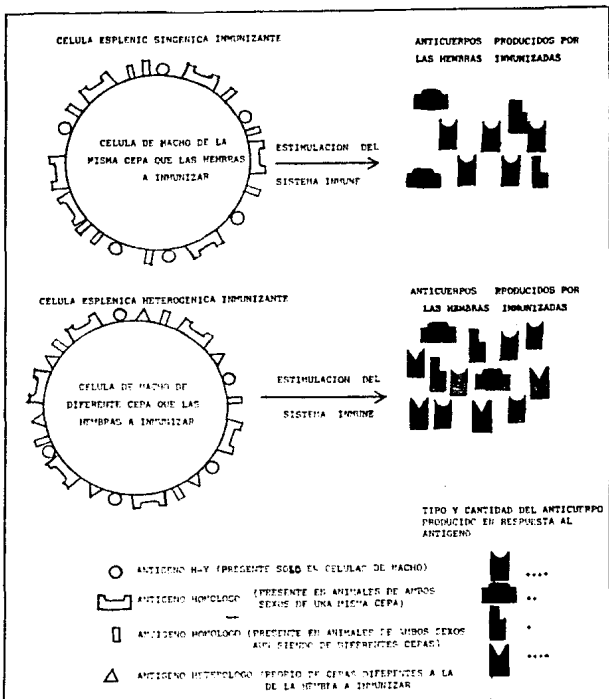


Figura 10. Respuesta inmune vs. el antígeno H-Y en hembras inmunizadas con células singénicas de bazo.

et al., 1983). Solo un 30% de los ratones inmunizados producen suero anti H-Y aceptable (Koo, 1981).

c) suero anti H-Y "contaminado" con autoanticuerpos dirigidos contra otro tipo de antígenos diferentes al H-Y (Onno et al. citado por Iyer et al., 1989). A pesar de que para la producción de este antisuero se inmunizan ratones hembras de cepas altamente consanguíneas con células singénicas de bazo (Anderson, 1987; Iyer et al., 1989; Koo, 1981; Piedrahita y

Anderson, 1985; White et al., 1983 y 1987) en el supuesto de que la respuesta inmune de estas hembras irá dirigida contra el antígeno H-Y principalmente (figura 10), se produce respuesta inmune también contra antígenos homogénos (presentes por igual en machos y hembras de una misma cepa) y se piensa que se debe a pérdida o ruptura de la tolerancia a esos antígenos.

Existen varios mecanismos por los que se puede "romper" la tolerancia. Gómez de la Concha et al. (1988), señalan que "... en ocasiones, antígenos propios, modificados por causas muy diversas, pueden volverse inmunogénicos. Esto ha sido muy empleado para producir modelos experimentales de enfermedades autoinmunes (por ejem. tiroglobulina homogénea o heteróloga en adyuvante de Freund para inducir tiroiditis en diversos animales)". Otro mecanismo conocido y, probablemente el más común, por el cual se interrumpe la tolerancia es el de las infecciones (sobre todo las virales) en las que antígenos del microorganismo están presentes en la membrana de la célula infectada, provocando una respuesta inmune no sólo contra los antígenos externos sino que también contra los propios. Ambos mecanismos pueden presentarse durante la producción de suero anti H-Y utilizando células esplénicas. El primero se explicaría por las inmunizaciones repetidas con adyuvante. En el segundo

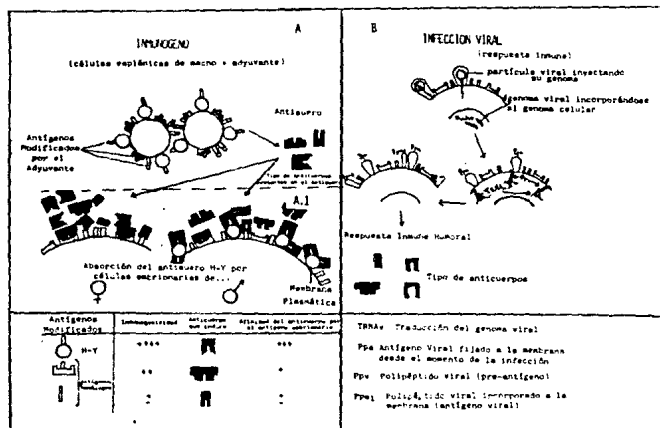


Figura 11. Anticuerpos producidos por hembras en respuesta a la inmunización con células esplénicas de macho (A) o a la entrada de un antígeno exógeno (virus, H-Y, etc.) (B) y adsorción del anticuerpo H-Y por células embrionarias de hembra o de macho (A.1).

mecanismo, el antígeno H-Y sería el análogo del antígeno viral fig. 11. Es por ello que al cultivar embriones en antisuero H-Y se verán afectados también algunos embriones hembras.

La figura 11A, muestra como los antígenos modificados estimulan al sistema inmune para la producción de anticuerpos. Los antígenos homólogos modificados tienen antigenicidad baja o nula debido a su similitud con los antígenos naturales, por tanto, solo el antígeno heterólogo (modificado o no) inducirá una respuesta inmune de importancia. En la figura 11 A.1 se muestra la diferencia en absorción del antisuero H-Y (ver posteriormente) por células embrionarias de hembra o de macho. Cuando el antisuero es absorbido por células de hembra algunos autoanticuerpos y poco o nada del antisuero H-Y es absorbido. En cambio, cuando el antisuero H-Y es absorbido por células de macho, además de los autoanticuerpos absorbidos por células de hembra, es absorbido también todo o casi todo el anticuerpo anti H-Y. En las infecciones virales (fig. 11B), el linfocito T cooperador reconoce como extraño al antígeno viral y, de igual manera, a toda la célula estimulando a diferentes clones de linfocitos B para la producción de anticuerpos (respuesta inmune humoral). De la misma manera que en el ejemplo anterior, la respuesta inmune estaría dirigida principalmente contra el antígeno exógeno (en este caso el antígeno viral) pero también habrá producción de autoanticuerpos.

Una comprobación indirecta de esta hipótesis es la disminución de la actividad del antisuero durante las pruebas de especificidad del mismo. A continuación se mencionan estas pruebas de especificidad.

#### **Evaluación de la especificidad del antisuero para detectar el antígeno macho (H-Y).**

Para conocer la especificidad del antisuero que se quiere utilizar para sexar embriones, se toman alícuotas del suero y se añaden por separado a un medio en el que se estén cultivando células. Kuro y Goldberg (1976), utilizaron células esplénicas de macho de la cepa B6, células esplénicas de hembra de la misma cepa y medio control (sin células) como absorbentes del antisuero H-Y, para después desatirarlo en cultivos de embriones a los que se les añade complemento. Se esperaba que a mayor especificidad del suero, mayor sería la absorción de anticuerpos H-Y en el cultivo de células esplénicas de macho, baja o nula en el cultivo de células de hembra y nulo en el control. De la misma manera, la cantidad de embriones afectados al desatirar los antisueros postabsorción sería baja o nula para la alícuota absorbida en células de macho y cercana o igual al control para la alícuota absorbida en las células de hembra. Los resultados que obtuvieron se muestran en el cuadro IV.

Los resultados mostrados en el cuadro IV no dejan lugar a duda de que el suero fue absorbido preferentemente por antígenos propios de células masculinas. Este cuadro indica también que

existió cierta adsorción de anticuerpos en los embriones XX. Esta adsorción puede deberse a: la presencia en el antisuero de autoanticuerpos "contaminantes"; a antigenicidad cruzada entre el antígeno H-Y y otros antígenos de superficie o; a la presencia del antígeno H-Y en algunos embriones XX.

Cuadro IV. Adsorción de antisuero H-Y.

SUERO	EMBRIONES AFECTADOS
Control	53%
Absorbido en células de macho	0%
Absorbido en células de hembra	46%

Modificado de Krco y Goldberg (1976).

Variantes de esta técnica incluyen la adsorción del antisuero con otros tipos celulares (Iyer et al., 1989), prueba de citotoxicidad de espermatozoides en la cual se utiliza alguna tinción vital para conocer el número de espermatozoides afectados por el antisuero en un medio al que también se le añade complemento de cuyo (Piedrahita y Anderson, 1985; Goldberg, 1971). La adsorción se realiza comúnmente a 4 grados centígrados durante 30 min.

Anteriormente se mencionó que el antisuero producido en ratones puede ser utilizado en el sexaje de embriones de otras especies. En estos casos la adsorción debe hacerse con linocitos de hembras de esa especie con el fin de remover anticuerpos que se unan a los embriones por el hecho de no ser de origen murino quedando en el antisuero anticuerpos contra el antígeno H-Y en forma casi exclusiva (Anderson, 1987). Otra manera de evaluar la especificidad de este antisuero es la medición de los niveles de ATP en el medio resultante de una prueba citotóxica de espermatozoides ya que son indicativos de la proporción de células afectadas (Tung, citado por Piedrahita y Anderson, 1985).

Para finalizar, a manera de resumen se incluye a continuación la metodología a grasso modo aplicada en el sexado embrionario en la especie bovina y mediante la técnica de IFI.

Preparación del antisuero:

- a) Obtención de las células inmunógenas. Suspensión de células esplénicas, lavado y centrifugación.
- b) Inmunizaciones a ratones hembra. Concentración celular: 25-35 X 10 células. Calendario de inmunización: una vez a la semana por

tres semanas y posteriormente inyecciones de retuerzo cada 2 semanas.

c) Obtencion de 250-400 microlitros de sangre (por corte de cola o por puncion retroorbitaria). Las sangrias (máximo una vez al mes) se hacen 7-10 dias después de completar el periodo inicial de inyecciones o 7-10 dias después de la inyeccion de retuerzo proxima pasada.

d) Evaluacion del antisuero mediante la absorcion del mismo en linocitos de vaca seguida de pruebas de citotoxicidad en esperma o embriones y/o la medicion de los niveles de ATP (White *et al.*, 1987; Piedrahita y Anderson, 1985).

#### Coleccion embrionaria:

a) Superovulacion de las hembras donadoras. Cuarenta mg de FSH (dosis total) dividida en 8 inyecciones una cada doce horas y en dosis decrecientes: dos inyecciones de 8 mg el primer dia, 2 de 6 mg el segundo dia, dos de 4 mg el tercero y dos de 2 mg al cuarto dia. Este tratamiento da mejores resultados si se aplica entre los dias 9 y 14 del ciclo. Para destruir el cuerpo luteo se deben anadir 25 mg de prostaglandina F-2 alta al tercer dia de iniciado el tratamiento de FSH (Zarco, 1990). El estro se presenta 48-72 horas después de la inyeccion de la prostaglandina y las ovulaciones 24-48 horas post-estro.

b) Recoleccion de embriones. La coleccion no quirurgica se hace a los 6-8 dias post-estro. Los embriones estaran en etapa de morula o de blastocisto tardio (White *et al.*, 1987).

#### "Cultivo" embrionario

a) Los embriones se cultivan en medio de Ham F-10 (HF-10) con 10% (V/V) de suero anti H-Y murino durante 90 min.

b) Después de un lavado se cultivan en medio HF-10 al que se le anadio 10% (V/V) de suero anti IgG murino marcado con ITC-F (Booman, 1988; Piedrahita y Anderson, 1985; White *et al.*, 1987) durante 90 min. y se vuelven a lavar para eliminar la fluorescencia no especifica.

#### Evaluacion de la fluorescencia

La evaluacion de la fluorescencia se hace a un aumento de 200X con microscopio invertido de contraste de fases equipado para este fin. Los embriones se clasifican como H-Y positivos solo si se observan áreas de fluorescencia intensa localizada o de forma granular (White *et al.*, 1987).

#### Comprobacion

La comprobacion se puede hacer por analisis cromosomico de los embriones o por transferencia de los embriones y el registro del sexo al nacimiento.

#### 4.4 SEXAJE EMBRIONARIO POR ANALISIS CROMOSOMICO O CITOGENETICO (cariotipo)

El sexado de embriones mediante el analisis cromosomico se puede realizar por dos procedimientos: observacion del corpusculo de Barr (el cual corresponde al cromosoma X inactivo) o analizando el cariotipo. La primera de estas dos técnicas, aunque rapida y sencilla, no puede llevarse a cabo en la mayoría de las especies domesticas debido a que el aspecto granular del citoplasma dificulta enormemente la identificación de dicho corpusculo. Además, en especies como la bovina, el corpusculo no es visible en las etapas en las que el embrión es transferible (King, 1984; Wintenberger-Torres y Popescu, 1980).

En cuanto al cariotipo, si se puede realizar en las especies domesticas y, de hecho, tiene una certeza casi del 100% en la mayoría de los casos (King, 1984, Leibo y Rall, 1990; Picard et al., 1985; van Vliet et al. 1989). Alternativamente al sexado de los embriones, el cariotipo permite detectar aberraciones cromosomicas pudiéndose desechar de esta manera aquellos embriones que las presenten (Picard et al., 1985) y, en ingeniería genética, permite detectar a los embriones transgénicos (Leibo y Rall, 1990). En esta sección se procederá a dar generalidades sobre esta técnica analizando sus ventajas y desventajas en el sexado de embriones y en el apéndice (pag. 92-97) se ahondará sobre las técnicas de bandeo.

#### Cariotipo como medio para sexar embriones

El cariotipo se puede definir como el estudio del número, morfología y características tintoriales de los cromosomas de un individuo cualquiera.

Premisas y pasos para la realización de un cariotipo. Existen ciertas premisas generales para la realización de un cariotipo sea cual sea la técnica de bandeo. Entre estas se tiene: 1) los cromosomas se deben observar torzosamente en la metafase o en fases cercanas a ésta por lo que el tejido o las células utilizadas deberán estar en fase de replicación o mitosis (Konne, 1989; Yoshizawa et al., 1990); 2) existe una correlación muy alta entre el número de células y/o el índice mitótico de estas y el número de metafases disponibles para el análisis cromosómico (Picard et al., 1985; Singh y Hare, 1980; Wintenberger-Torres y Popescu, 1980); 3) no todas las metafases observadas en una laminita tienen la suficiente calidad para ser tomadas en cuenta en el diagnóstico (Singh y Hare, 1980; Yoshizawa et al., 1990); 4) este procedimiento daña a las células por lo que, para los embriones a transferir, se hace necesario la toma de una biopsia. De estas premisas se puede inferir que los embriones en las etapas ideales para su transferencia (morula tardía y blastocisto

temprano; Singn y Hare, 1980) presentaran grandes dificultades en cuanto al numero de células "disponibles" para el cariotipo a partir de una biopsia. Pero bien, antes de analizar las ventajas y las desventajas de estas técnicas se dara, a manera de resumen, un bosquejo general de cuales son los pasos que se siguen en la preparación de las células para realizarles el cariotipo:

1) Se obtiene la muestra, que en este caso corresponde a células de una biopsia de embrión.

2) Se puede o no hacer cultivo celular (varios días) en un medio que contenga alguna substancia mitogena como la titoheماغلوتينina. Por supuesto, si se lleva a cabo este segundo paso, en el sexado de embriones se procederá también a la congelación del resto del embrión que se utilizará para la transferencia.

3) Previo análisis del número de células en cultivo, se añade a estas una substancia que "arreste" las células en mitosis como la colchicina o la colcemida.

4) Provocar que las células se hinchen utilizando una solución hipotónica con el fin de que los cromosomas se separen entre sí. Se fijan las células con metanol-acido acético. Y, por último, se tienen y se observan al microscopio (King, 1984; Ronne, 1989; Picard et al., 1985, van Vliet et al., 1989).

Cuadro V. Características morfológicas de los cromosomas sexuales en diferentes especies domésticas.

Especie	Número Cromosómico	Morfología	
		Cromosoma X	Cromosoma Y
<u>Bos taurus</u>	60	Largo submetacéntrico	Pequeño metacéntrico
<u>Bos indicus</u>	60	Largo submetacéntrico	Pequeño acrocentrico
<u>Ovis aries</u>	54	Largo acrocentrico	Muy pequeño metacéntrico
<u>Capra hircus</u>	60	Largo acrocentrico (con brazo corto muy pequeño)	Muy pequeño metacéntrico
<u>Sus scrofa</u>	38	Tamaño medio metacéntrico	Pequeño metacéntrico
<u>Equus caballus</u>	64	Tamaño medio submetacéntrico	Pequeño acrocentrico

Tomado de King. (1984).

Los cromosomas sexuales tienen morfología variada en las diferentes especies pero aun así son fácilmente identificables en cada especie como indica el cuadro V (King, 1984). En el novino, por ejemplo, los cromosomas sexuales X son los más grandes y son



muy fáciles de distinguir ya que son los únicos metacéntricos o submetacéntricos, mientras que los autosomas son acrocéntricos. En cuanto al cromosoma Y en el Bos taurus es metacéntrico y en el Bos indicus es acrocéntrico (King, 1984; Leino y Rail, 1990; Picard et al., 1985).

La detección de 2 cromosomas X o uno Y se considera suficiente para el diagnóstico (Picard et al., 1985) o también el hallazgo del cromosoma Y sin examinar los X (Yoshizawa et al., 1989b).

**VARIABLES EMBRIONARIAS EN EL SEXADO POR CARIOTIPO.** Toda técnica presenta ciertas variables la mayoría de las cuales se intentan controlar para aumentar la veracidad al interpretar los resultados. Las variables que se manejan con respecto al sexaje citogenético en embriones, de las cuales depende en gran parte el éxito o fracaso de la técnica y que tienen que ver con el número celular, son: edad del embrión, viabilidad del embrión, número de células en la biopsia y número de células en replicación (índice mitótico) (Singh y Hare, 1980; Picard et al., 1985; Wittenberger-Torres y Popescu, 1980; van Vliet et al., 1988).

**Edad del embrión.** De las variables antes mencionadas tal vez la edad del embrión sea la más importante ya que de ésta dependen en gran parte la mayoría de las otras. Por ejemplo, los embriones de 6-7 días (estro = día 0) son los más viables para la transferencia tanto porque son los que mejor índice de preñez presentan (Singh y Hare, 1980) como porque son los de mayor supervivencia en cultivo o en el proceso de congelación-descongelación (Picard et al., 1985; Singh y Hare, 1980), en comparación con embriones de 12-15 días (en etapa de blastocisto tardío). Además, el reconocimiento de la gestación se lleva a cabo en los días 15-16 en novinos (Roberts et al., 1990), por lo que la transferencia debe hacerse en etapas previas.

Parece ser que la toma de la biopsia afecta el desarrollo de los embriones de novino a menos que se lleve a cabo en etapas anteriores a los 13 días, es más, el cultivo de embriones en etapas avanzadas de diferenciación (blastocisto tardío) dificulta su posterior desarrollo ya que el medio de cultivo no alcanza a satisfacer los requerimientos nutritivos de estos embriones (Wittenberger-Torres y Popescu, 1980).

**Número celular e índice mitótico.** Como se vio al inicio de este capítulo, los embriones en etapa de morula tienen aproximadamente 16-64 células y en etapa de blastocisto temprano cuentan con cerca de 100 células (Betteridge, 1988), por lo que, en el caso de que se bisecten estos embriones (utilizando una de las mitades para el análisis cromosómico y la otra mitad para la transferencia) se contaría con un máximo de 8 a 50 células para analizar a menos que se haga cultivo celular. Moustafa et al. (citados por Singh y Hare, 1980), con biopsias de solamente 7-10 células de embriones de 6-7 días lograron sexar al 76% de los embriones lo que supone un índice mitótico muy alto (superior al 1%) para poder encontrar más de una metatasa por laminilla. Picard et al. (1985), sexaron un 62.5% de embriones (n=8)

disectados (25-50 células y 1.5-3.2 figuras metafásicas) y Yoshizawa *et al.* (1989a y 1990), lograron sexar el 78.5 y 72% de embriones de ratón de tan solo una célula (n = 499 y 189, respectivamente).

En contraste, Singh y Hare (1980), solo lograron sexar al 33% de embriones de 6-7 días obteniendo biopsias de 15-17 células; Yoshizawa *et al.* (1989b), sexaron el 27.2 y el 50% de embriones caprinos en etapas de mórula y diastocisto; Murray *et al.* (1986), obtuvieron figuras metafásicas aceptables del 20% de embriones (n=290), en la etapa de mórula dieron mejores resultados que los embriones de 8-16 células. Wintenberger-Torres y Popescu (1980), lograron sexar al 60% de embriones de 13 días con biopsias de 130 a 400 células a partir de células del trofoblasto (1/10 a 1/3 del embrión) con índice mitótico del 4% y 5 a 16 metafases por laminilla. En el último ejemplo es notoria la ventaja en cuanto al número de células por biopsia pero tiene como desventaja que los embriones de esta edad (12-15 días) son poco viables para el cultivo o la congelación por lo que se hace necesaria una técnica muy rápida a partir de su recolección para poder transferirlos en "fresco" después de sexados (King, 1984; van Vliet *et al.*, 1989), técnica que en la actualidad requiere de un mínimo de 5 hrs para sexar 12-15 embriones por 2 citogenetistas expertos (King, 1984). Los resultados en los diferentes estudios parecen indicar que también la especie, la técnica y o sus ejecutantes, tienen que ver en la efectividad del sexado por medios citogenéticos.

De lo dicho en el párrafo anterior se desprende la importancia del número de células y del índice mitótico de estas. Singh y Hare (1980), compararon los índices mitóticos de embriones en etapa de mórula de tres especies diferentes cultivados con 50 ng/ml de colcemida por 4-6 horas, los resultados se observan en el cuadro VI.

Cuadro VI. Índices mitóticos de embriones en la etapa de mórula de las especies bovina, leporina y murina.

Especie	No. embriones	Promedio de células por embrión	Promedio del Índice Mitótico
Bovino	35	50.2	8.9
Conejo	53	44.3	12.1
Ratón	23	39.7	7.5

Modificado de Singh y Hare (1980).

Del cuadro VI, se deduce que con este número celular (23-53 células) e índice mitótico (7.5-12.1), se obtendría un máximo de 2.5 metafases por embrión disectado por lo que se necesitaría mucha suerte para que ambas metafases fueran de suficiente calidad para el análisis.

Ya se mencionó que los embriones de 6-7 días pueden

congelarse por lo que se resuelve, al menos parcialmente, el problema del bajo número de metatasas analizables mediante el cultivo de las células de la biopsia el tiempo necesario (3-10 días o más) para que aumente la población celular a un número deseable (>100 células) asegurándose así la obtención de una o más metatasas por laminilla y embrión aun en los casos de índice mitótico bajo (<5%). Se dice que el problema está resuelto parcialmente ya que el índice de preñez disminuye significativamente en embriones congelados en comparación con los transferidos en "fresco". Por ejemplo, Picard *et al.* (1985), reportaron tan sólo un 23.1% de nacimientos de 2<sup>os</sup> embriones de 7 días bisectados, sexados y congelados siendo que el éxito en la transferencia de los embriones bisectados, sexados y transferidos en "fresco" fue del 60%.

Se puede concluir que:

- Las etapas de morula o blastocisto temprano, aunque las más viables para la transferencia, tienen la desventaja de poseer un bajo número de células para la biopsia. Por lo que se hace indispensable la congelación del embrión a transferir y el cultivo de células de la biopsia para aumentar su número. Asegurando así, una cantidad deseable de metatasas analizables por laminilla y embrión (Picard *et al.*, 1985; Singh y Hare, 1980; van Vliet *et al.*, 1989).

- Los embriones de 12-15 días tienen un número deseable de células para el sexado por cariotipo (alrededor de 1300) pero en esta etapa los resultados de la transferencia embrionaria (supervivencia post-descongelación e índice de concepción) son más bien pobres (Wintenerger-Torres y Popescu, 1980).

- Los métodos citológicos son costosos por lo que la utilización de estos métodos citológicos con fines comerciales es poco alentadora. Pero la certeza que se obtiene con estas técnicas (cerca al 100%), lo hacen un método idóneo en la evaluación de otras técnicas tanto para el sexado embrionario como para el sexado de esperma o para otros fines (King, 1984; van Vliet *et al.* 1989).

- La efectividad en la realización del cariotipo es variable y depende de la especie, de la técnica empleada y/o de la habilidad de los técnicos.

## SEXAJE EMBRIONARIO MEDIANTE HIBRIDIZACION DEL DNA (sondas de DNA Y-especificas)

Al igual que en el analisis citogenetico estudiado anteriormente, esta metodologia (hibridizacion del DNA) daña el material biologico a utilizar por lo que es indispensable realizar la tecnica sobre células de una biopsia. Ahora bien, tiene la ventaja de que se necesita un bajo numero de células (10-20; Leonard et al., 1987) ya que se requiere una intima cantidad de DNA para realizar la prueba, no es necesario que estas células estén en mitosis (se puede realizar igualmente con nucleos interrásicos o en division; Bondioli et al., 1989; Müller et al., 1987); van Vliet et al., 1989; West et al., 1987) y se puede realizar en un corto tiempo (30 horas; Leonard et al., 1987). Además, si se combina esta tecnica con la de reacción de polimerasa en cadena (PCR, por sus siglas en inglés) el sexado puede realizarse en un tiempo tan corto como 3 horas y con menor cantidad de DNA (Herr et al., 1990a).

La hibridización con sondas DNA Y-especificas para el sexado embrionario consiste en: 1) detectar secuencias nucleotidicas en el cromosoma Y que sean exclusivas del mismo, esto es, que no se encuentren normalmente en ningún otro cromosoma (ya sea el X o algun autosoma), 2) sintetizar estas secuencias (sondas) marcándolas radioactivamente (Bondioli et al., 1989) o por medio de colorantes de reacción enzimática (Kirzenbaum et al., 1990; Leonard et al., 1987), 3) realizar la hibridización de estas sondas con material genético problema (DNA de células embrionarias); y, por último, 4) leer el resultado. Por supuesto, el resto del embrión que no se incluye en la biopsia se utiliza para transferirlo a una receptora despues de saber el diagnóstico del sexo.

La obtención de las secuencias nucleotidicas del genoma celular así como las técnicas de hibridización del DNA se explicarán en detalle bajo el inciso de tecnología de DNA recombinante, aquí solo se mencionan algunas características de estos metodos con el fin de que quede clara la referencia que a continuación se hace sobre los trabajos de sexaje de embriones mediante hibridización del DNA.

Como se mencionó arriba, las sondas de DNA son porciones de DNA sintetizadas artificialmente. Si para la síntesis de estas secuencias se utilizan nucleótidos marcados, estas sondas pueden ayudar a detectar la presencia e inclusive la cantidad de porciones homologas a esta dentro de un DNA problema. Esta capacidad de la sonda de detectar sus secuencias homologas se debe a las características de complementariedad de bases que presentan los ácidos nucleicos. Esto es que, en el ácido desoxirribonucleico por ejemplo, una timina siempre se apareará

con una adenina y una guanina con una citosina. De esta manera una cadena de DNA se apareara con otra cadena de DNA con tanta afinidad y estabilidad como complementariedad presente su secuencia de bases. A la unión de estas dos cadenas, la cadena natural y la sintética (radiactiva), es lo que se ha dado en llamar hibridización del DNA. Una variante de esta técnica es el realizarla sobre células en interfase o, si se requiere, células en metáfase fijadas a una laminita y se le conoce como hibridización *in situ*. Esto elimina la necesidad de extraer el material genético de la célula además de permitir la localización espacial de la(s) secuencia(s) homóloga(s) de la sonda dentro de los cromosomas (Pinkel et al., 1986).

La lectura del resultado en el caso de que se utilicen sondas radioactivas se hace exponiendo el material problema a película autoradiográfica (Alberts et al., 1987 y 1989). En el caso de que la sonda se marque con algún colorante de reacción enzimática la lectura se logra amplificando la señal por medio de técnicas inmunocitoquímicas (Kirzenbaum et al., 1990; Leonard et al., 1987; Weier et al., 1990).

#### Orígenes del sexado embrionario mediante hibridización del DNA

La tecnología del sexado mediante hibridización derivó de los estudios encaminados a la búsqueda del gen responsable de la determinación sexual, a saber el TDF (van Vliet et al., 1989), cuya localización siempre se ha sospechado en el cromosoma Y (en el capítulo V se mencionan interesantes descubrimientos recientes sobre este gen y su rol en la determinación sexual). En la actualidad, a diferencia del cromosoma X, se conocen pocos genes del cromosoma Y. En humanos se conocen: el gen que codifica para el TDF (Page et al., 1987; Simpson et al., 1987), el que codifica para el antígeno H-Y, el que codifica para el antígeno 12E7 (presente en linfocitos T leucémicos, genes para dos polipéptidos de función desconocida Y, posiblemente, genes involucrados en la espermatogénesis y el tamaño de los dientes (van Vliet et al., 1989). Todos estos genes están localizados en regiones eucromáticas del brazo corto del cromosoma Y (Yp) y en la región proximal del brazo largo (Yq) excluyendo al centromero. Por lógica, entre más genes se logren secuenciar en el cromosoma Y, más genes exclusivos de este cromosoma y sus sondas correspondientes podrán ser descubiertas.

Se han identificado y clonado secuencias Y-específicas del humano, del ratón, del bovino y del ovino. En el humano la mayoría de las sondas obtenidas corresponden a la zona eucromática del cromosoma Y (van Vliet et al., 1989) como las sondas Y-190 (secuencia repetitiva; Müller et al., 1987) y la 49t (secuencia sencilla; Vergnaud et al., 1984). En el bovino se conocen, entre otras, las sondas ES5, ES6.0, ES8 (todas secuencias repetitivas; Bondioni et al., 1989), la BC 1.2 (secuencia repetitiva; Kirzenbaum et al., 1990) y la BRY4 (Herr et al., 1990b); del ovino, la OY11.1 (Herr et al., 1990a).

Utilidad de las secuencias (unicas y repetitivas) en la hibridización del DNA con fines de diagnóstico sexual. La mayoría de las secuencias o genes contenidos en el DNA celular están presentes como secuencias unicas (sencillas) o con algunas pocas copias por genoma haploide, el demás DNA corresponde a secuencias que tienen cientos o miles de copias (Alberts, et al., 1987) y pueden tener homología en cromosomas no homólogos (Bondioli et al., 1989; van Vliet et al., 1989; West et al., 1987). Las secuencias unicas o de pocas copias en el genoma, son generalmente exclusivas de un par cromosómico, por tanto, más específicas que las secuencias repetitivas (van Vliet et al., 1989; Vergnaud et al., 1984). Así, es casi indispensable utilizar secuencias altamente repetitivas para el sexado de embriones mediante técnicas de hibridización ya que en el caso de las secuencias unicas es difícil interpretar los resultados debido a la débil respuesta que se obtiene y a que se necesita mayor cantidad de DNA (y de células) para las secuencias unicas en comparación con las secuencias de miles de copias en el genoma (Muller et al., 1987; Vergnaud et al., 1984). De hecho, la mayoría de las sondas comerciales utilizadas en el sexado de embriones se obtuvieron a partir de Yq que contiene secuencias no exclusivas del cromosoma Y (van Vliet et al., 1989).

Los primeros trabajos encaminados a hacer el sexado prenatal por medio de técnicas de hibridización se hicieron en humanos. Entre otros tenemos los de:

- Gosden et al. (1982), que diagnosticaron correctamente el sexo de 13 fetos a partir de biopsia de vellosidades coriónicas utilizando una sonda localizada en Yq de 3.4 kilobases (kb).

- Vergnaud et al. (1984), hicieron el diagnóstico del sexo de 12 fetos utilizando como fuente de DNA células del trofoblasto a partir de biopsia placentaria. En este estudio se trabajó con dos sondas Y-específicas una de las cuales corresponde a DNA repetitivo (sonda P1) y la otra (sonda 49t) a DNA de secuencia única, ambas en la porción Yq. La cantidad de DNA utilizada fue de 3 microgramos y el tiempo de realización fue de 2 días. El DNA se obtuvo mediante extracciones repetidas con fenol/clorotorno.

- West et al. (1987), sexaron 7 embriones, la mayoría de 2 a 3 células mediante la técnica de hibridización in situ. El diagnóstico requirió de 4-8 días (3-7 de exposición de las autoradiografías).

En los animales domésticos estas técnicas se han utilizado apenas recientemente.

- Leonard et al. (1987), utilizaron una sonda Y-específica bovina de 2500 copias aproximadamente (van Vliet et al., 1989) marcada con biotina. Obtuvieron biopsias de 10-20 células a partir del trofoblasto de embriones de 7-8 días y las fijaron a laminillas para realizar la hibridización in situ. Obtuvieron mediante esta técnica una certeza de 95 % con respecto a los embriones sexados pero solo pudieron sexar 85 de 150 biopsias (57%).

- Bondioli *et al.* (1989), identificaron y aislaron tres secuencias repetitivas de bovino Y-específicas, de las cuales obtuvieron las sondas ES5, ES8 y la ES6.0 de aproximadamente 2600, 600 y 20 copias, respectivamente. La realización del diagnóstico mediante esta técnica les tomó 8 días (1 día para extracción y prehibridación, 1 día para hibridación y 6 días de exposición a la película radiossensible). Por lo que se hace indispensable la congelación de los embriones que se utilizarán en la transferencia. En el experimento 1, de 101 biopsias embrionarias lograron sexar 91 embriones (90%), transfirieron 87 obteniendo un índice de preñez del 40% y de estos, 34 de 35 fetos (97%) se sexaron correctamente. En un segundo experimento, de 111 embriones transferidos post sexado y descongelación, cuyo índice de preñez fue 41%, nacieron 37 becerros vivos el 100% de los cuales fue del sexo diagnosticado.

- En un estudio, Kirzenbaum *et al.* (1990) intentaron sexar embriones bovinos tanto por la técnica de hibridación *in situ* como con ayuda de la técnica de PCR. Por medio de hibridación *in situ* sexaron biopsias (10-20 células) de embriones bovinos en etapa de blastocisto (7 días). Utilizaron la sonda BC 1.2 de 2000 copias (marcada con biotina), sexaron correctamente (corroborando el diagnóstico por análisis citogenético) 18 de 19 muestras. Previamente al sexado embrionario y, para conocer los límites de resolución de la técnica, "diagnosticaron" el sexo (conocido) de animales adultos (vacas y toros) observando los cromosomas sexuales de sus linfocitos. El 85% de los linfocitos de origen macho presentó reacción positiva a la sonda Y-específica al igual que el 8% de los linfocitos de origen hembra. Concluyeron que el 15% de los linfocitos de origen macho no se marcaron debido a factores fisiológicos de las células (condensación excesiva del material genético debido a la etapa celular en la que se encuentran) o debido a una desnaturalización insuficiente del DNA. Los linfocitos de origen hembra que se marcaron fue atribuido a una precipitación no específica. En los estudios preliminares con la técnica de PCR concluyeron que se requiere de 10 a 40 células (50-200 pg de DNA) para amplificar la secuencia deseada.

#### **Poliomerasa de reacción en cadena (PCR).**

Aunque la técnica de PCR, mencionada arriba, no es hibridación sino clonación del DNA, se incluyen aquí algunos trabajos que utilizan este método ya que derivan de tecnología *in situ*. De hecho, cuando las técnicas de hibridación se complementan con la de PCR, la reacción es más intensa, rápida y específica mejorando en mucho las posibilidades de diagnóstico.

Esta técnica tiene como principal característica el amplificar (en forma automatizada) la secuencia de DNA deseada, aún secuencias únicas (Kogan *et al.*, citados por Handyside *et al.*, 1989). Esto quiere decir que, por medio de reacciones enzimáticas controladas, se puede sintetizar y multiplicar miles

y hasta millones de veces, una secuencia de DNA problema en unas cuantas horas (Alberts et al., 1989).

Algunos de los trabajos de sexado embrionario en los que se ha utilizado la técnica de PCR como parte de la metodología de hibridación del DNA son:

- Handyside et al. (1989), sexaron correctamente el 100% de embriones de humano morfológicamente normales (n = 15). Utilizaron una sonda repetitiva de 3,400pb amplificada por PCR. El sexo se confirmó mediante análisis citogenético. La realización de la técnica requirió un tiempo de 5 hrs.

- Un grupo de investigadores de la Universidad de Canberra (Australia) encabezados por Herr, han estado trabajando recientemente sexando embriones de ovinos (Herr et al., 1990a), bovinos (Herr et al., 1990c) y, para comprobar la efectividad de la prueba, también sexaron linocitos de bovinos adultos de varias razas y cruza (Herr et al., 1990b). Para sexar los embriones ovinos primero los dividieron obteniendo de 3-5 "secciones embrionarias" de cada uno (embriones en etapa de mórula o blastocisto). De 56 secciones sexadas solamente 2, cada una de diferente embrión, no correspondió al diagnóstico sexual de sus "gemelas". El sexado se llevó a cabo en tan solo 3 horas. El fragmento de DNA clonado en esta prueba fue una tracción de 124 pares de bases (pb) específico de ovino y conocido como OY11.1. El sexado de embriones bovinos, realizado en el campo, dió por resultado el sexado correcto de 11 de 12 embriones cuya comprobación se hizo al nacimiento de los becerros.

La tecnología de PCR tiene entre otras características, una sensibilidad impresionante (al grado de poder utilizar un espermatozoide como fuente del DNA problema). Esto es una ventaja y una desventaja al mismo tiempo ya que se pueden contaminar fácilmente los reactivos (Handyside et al., 1989). En definitiva es tecnología de amplísima aplicación actualmente, no solo en el sexado embrionario. En el inciso sobre tecnología del DNA recombinante (págs 101-111) se darán más detalles sobre esta técnica.



Para terminar con lo referente al sexado embrionario, y a manera de colorario, en el cuadro VII se indican algunos de los resultados obtenidos con estas técnicas.

Cuadro VII. Sexado e índice de preñez subsecuente, en cuatro métodos de sexado embrionario.

Método	Embrión en etapa	Número de embriones	Eficiencia del sexado (%)	Índice de preñez	Especie
Enzimas X-ligadas	mórula a diastocisto	516	64	35	ratón
	8 células	31	93	71	ratón
Antígeno H-Y	8 a 16 células	1000	85	MD	bovino
	4 células a diastocisto	258	87	NR	bovino
	mórula	8	86	87	bovino
	NR	68	85	63	ovino
Análisis cromosómico	8 células a diastocisto	59	81	NR	suino
	diastocisto eclosionado		68	33	bovino
	ESM fresco	8	60	60	bovino
	- congelado	28	60	23	bovino
Sondas Y-específicas	primer trimestre	77	100	--	humano
	mórula	101	76	44	bovino
	mórula	150	57	NR	bovino
	diastocisto eclosionado	7	85	NR	bovino

NR = no reportado.

MD = muy bajo.

ESM = embriones seccionados y transferidos en fresco o post-congelación descongelación.

Tomado de van Vliet *et al.* (1989).

**CAPITULO V**

**POSIBILIDADES FUTURAS PARA INFLUIR  
EN LA PROPORCION SEXUAL DE LA  
DESCENDENCIA**

## V POSIBILIDADES FUTURAS PARA INFLUIR EN LA PROPORCION SEXUAL DE LA DESCENDENCIA

### 5.1 INTRODUCCION

La razón de ser del sexo es la variación genica entre los individuos para su mejor adaptación al medio y para la evolución y conservación de las especies. Para ello, es necesario que los animales tanto de uno como de otro sexo produzcan gametos fértiles. Los métodos expuestos en capítulos anteriores proponen la manipulación de la proporción sexual al nacimiento (psn) en forma hasta cierto punto ajena a la fisiología reproductiva y, más concretamente, gametogénica, de los progenitores. Todos estos métodos tienen en común que para hacer variar la psn (en caso de ser efectivos) siempre se requerirá de dar un "tratamiento particularizado" ya sea a las hembras, gametos o a embriones. Dicho de otra manera, cada tratamiento solo servirá para una copula, un eyaculado o para los embriones que se tengan en el momento. Las hipótesis que a continuación se proponen, pretenden hacer variar la psn de una manera más radical y permanente influyendo principalmente sobre la gametogénesis en el macho por ser el sexo heterogamético (en mamíferos); de tal manera que algunos de los espermatozoides utilizados para la reproducción produzcan semen enriquecido parcial o totalmente en uno de los gametos (X o Y). Así, la psn de la descendencia de estos animales se vería drásticamente manipulada.

Los medios que se proponen manipular para crear espermatozoides con estas características son: la selección; disrupción de puentes citoplasmáticos; fenómeno de segregación distorsionada; la reversión sexual; y la creación de animales transgénicos. A decir verdad, la mayoría de estas hipótesis no pasan de ser ideas futuristas más que hipótesis formales ya que, a la fecha, hay carencia tecnológica y/o de conocimientos básicos para poder formular un protocolo de investigación propiamente dicho.

## 5.2 SELECCION DE SEMENTALES PARA LA PSN

En su revision, Honenboken (1981), cita numerosos estudios en diferentes especies domesticas (bovinos, ovinos, caninos, suinos y aves) y en animales de laboratorio, que sugieren fuertemente la existencia de diferentes psn entre especies, razas, lineas, cepas o individuos. Por ejemplo, Powell et al. (1975), estudiando la psn de la descendencia de toros Holstein cuyo semen fue utilizado en inseminacion artificial, encontraron variaciones en la psn de 0.39 a 0.64 entre la descendencia de los diferentes sementales.

Una de las posibles razones por las que se da la diferente psn entre la descendencia de diversos machos es que estos produzcan gametos X o gametos Y en mayor proporcion. En el humano, Quinlivan et al. (1982), observaron que el rango en la proporcion de espermatozoides Y (tenidos con quinacrina) en 28 varones fue de 34 a 57%. En los varones de 10 parejas que tenian 3 o más niñas y ningun hijo al momento del estudio, Omowski et al. (1979), encontraron que el porcentaje de espermatozoides Y era de 43+- 6%, siendo estadisticamente diferente a nivel de  $P < 0.02$  con respecto a los valores obtenidos con esperma de individuos normales. En la mosca de la fruta (*Drosophila*) y en ratones, se ha observado un fenomeno conocido como segregacion distorsionada en la cual los machos pueden producir un mayor porcentaje de alguno de los gametos (ver distorsion de la proporcion de transmision, pag 77). Un fenomeno similar podria estarse manifestando en estos varones.

Honenboken (1981), senala que: En caso de ser cierta la variacion genetica para la proporcion sexual de la descendencia, y si una parte de esta variacion es aditiva, sera factible la seleccion direccional para alterar la psn en una poblacion. Si los genes que influyen sobre la psn tienen efectos pleiotropicos sobre otros caracteres (o si esos loci estan ligados a genes que afectan otros caracteres), entonces ocasionalmente deberia haber respuesta correlacionada en la psn al seleccionar para otra caracteristica.

### 5.3 DISRUPCION DE LOS PUENTES CITOPASMATICOS EN LA ESPERMATOGÉNESIS

A lo largo de la espermatocitogénesis y espermiogénesis, los gametos en formación están unidos por puentes intercelulares o citoplasmáticos que se derivan de una citoquinesis incompleta. Estos puentes comunican directamente a las células con células adyacentes de tal manera que forman una especie de sincitio (figura 12).

Los excelentes estudios de Weber y Russell (1987) y de Russell *et al.* (1987) sobre los eventos citológicos relacionados con la formación de los puentes citoplasmáticos, permiten ver lo complejo de estas estructuras. Los puentes citoplasmáticos no son estructuras estáticas como podría pensarse. Las dimensiones (largo y diámetro) varían constantemente, especialmente durante la espermiogénesis. Algunos puentes se forman desde el inicio y persisten durante toda la espermatogénesis, mientras que otros se desintegran e, inclusive, algunos más se forman durante la mitosis o la meiosis.

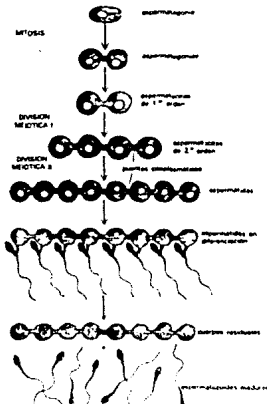


Figura 12. Comunicación entre las células por medio de puentes citoplasmáticos a lo largo de la espermatogénesis. Tomado de Aiberts *et al.* (1989).

### **Estructura de los puentes citoplasmáticos**

Como parte importante de la formación y desintegración de los puentes citoplasmáticos, interviene una estructura de origen retículoendotelial a la que Weber y Russell (1987) llamaron **complejos puente-divisorios**. Su función parece ser la de estabilizar los puentes citoplasmáticos temporalmente evitando su interrupción antes de que se formen puentes nuevos. De esta manera se mantiene la comunicación entre las clonas durante todo el proceso.

Ciertos tipos de actina y tubulina son sintetizadas específicamente durante la espermatogénesis, indicando una función especial del citoesqueleto en células postmeióticas (Hecht, 1988). Los filamentos de actina intervienen en la formación del surco de segmentación. Mientras que en células somáticas provocan la contracción de este surco a tal grado que permite la separación completa y permanente de las células hijas. En la gametogénesis sucede un evento especial que detiene la estrangulación del surco en un momento dado, permitiendo así la persistencia de comunicación entre las células. Parece ser que unas proteínas **ligadura-cruzada** con actina estabilizan los filamentos de esta proteína evitando su desfilamiento entre ellos y la separación de las células (Russell *et al.*, 1987).

### **Función de los puentes citoplasmáticos**

Durante la meiosis los cromosomas homólogos son segregados. De la misma manera, los alelos homólogos para un mismo carácter estarían distribuidos al azar entre las diferentes espermatidas resultando células haploides genéticamente distintas. Aunque no se sabe la función o funciones exactas de los puentes citoplasmáticos se piensa que la difusión de ciertas sustancias (v.gr. proteínas, RNAm, etc) a través de los mismos sea de suma importancia para la espermatogénesis al asegurar desarrollo sincrónico de las clonas y equivalencia gamética entre las espermatidas (Alperis *et al.*, 1987; Braun *et al.* 1989).

Con objeto de determinar la existencia o no de difusión de productos celulares a través de los puentes citoplasmáticos, Braun *et al.* (1989), crearon ratones transgénicos hemicigotas (el DNA introducido está presente en uno de los cromosomas homólogos de un par cualquiera, por lo tanto, después de la meiosis, solo la mitad de las espermatidas portan el transgene). El transgene utilizado fue el mPI-nGH que corresponde a un híbrido de la protamina I murina (su expresión solo se da durante la fase postmeiótica; Hecht 87, 88 y 90) y el gene de la hormona del crecimiento humana. Demostraron que el producto de este transgene estaba distribuido por igual en todas las espermatidas a pesar de ser genéticamente distintas.

**Hipotesis.** El cromosoma X porta genes "housekeeping" (sin traducción literal) esenciales para la supervivencia de toda célula por codificar para sustancias que intervienen en el metabolismo intermediario. Aunque se dice que el cromosoma X está inactivo durante la espermatogénesis, es muy posible que algunos de sus genes (entre ellos los housekeeping) escapen a la inactivación (Jablónka y Lamb, 1988). De no ser por los puentes citoplasmáticos la expresión génica postmeiótica haría de las espermatides células fisiológicamente distintas. Al interrumpir la comunicación entre las espermatidas, aquellas con cromosoma sexual Y, el cual carece de genes housekeeping, tendrían pobre o nula supervivencia. De esta manera la disrupción de los puentes intercelulares podría favorecer la producción de espermatozoides X (Alberts et al., 1987), o, lo que es lo mismo, sementales cuya descendencia sea exclusivamente del sexo femenino.

La disrupción de los puentes citoplasmáticos puede intentarse mediante procedimientos genéticos (mutaciones) o mediante tratamientos químicos altamente específicos que provoquen la desintegración de los complejos puente-divisorios y/o la disjunción de las proteínas que fijan los filamentos de actina. De esta manera, se completaría la citoquinesis quedando las células incomunicadas entre sí.

La compleja estructura y el dinamismo de los puentes citoplasmáticos, como muestran los estudios de Weper y Russell (1987) y Russell et al. (1987), hacen difícil creer que la disrupción de estas comunicaciones durante la espermatogénesis no afecten directa e indirectamente varios aspectos fisiológicos de las células germinales haciendo un caos de la misma.

#### 5.4 DISTORSION EN LA PROPORCION DE TRANSMISION (TRD)

Cerca del 50% de la descendencia de machos heterocigotos para un alelo recesivo cualquiera, deberían manifestar ese carácter al aparearse estos con hembras homocigotas para el mismo carácter, fenómeno que no se presenta en individuos con distorsión del porcentaje de transmisión (TRD, por sus siglas en inglés) también conocida como segregación distorsionada. Este fenómeno ha sido encontrado en el ratón y en *Drosophila melanogaster*. TRD parece ser que solo se manifiesta en machos heterocigotos y nunca en hembras (Honenboken, 1981).

En el cromosoma 17 de ratones se encuentra una región

llamada complejo t', la cual incluye una variedad de loci cuyos genes afectan el largo de la cola, la supervivencia embrionaria, la espermatogénesis y la fisiología espermática, la frecuencia de recombinación y la diseminación de haplotipos t particulares. En el complejo t' existen tres tipos de alelos: T, + y t, y de cada uno de ellos existen diferentes haplotipos. Las combinaciones posibles entre los alelos y según el haplotipo de cada alelo, provocan variaciones graduales en el fenotipo como: 1) los genotipos heterocigotos Tt y T+ provocan acortamiento y falta de la cola, respectivamente; 2) los machos heterocigotas para 2 diferentes haplotipos letales complementarios u homocigotas para un haplotipo semiletal, son estériles; 3) los machos heterocigotas para los genotipos T/t o +/t heredan el haplotipo t a más del 50% de su descendencia (TRD; Handel, 1987).

Hay diferentes grados de TRD lo cual parece deberse por una parte a la acción de 3 genes distorsionadores (Tcd-1, 2 y 3) que influyen en distintos grados y en forma aditiva sobre un gen de respuesta Ter provocando una mayor transmisión del alelo t en los genotipos T/T y +/T (Lyon, citado por Handel 1984). Por otro lado, la TRD en ratones parece deberse también a una mayor capacidad fertilizadora de los espermatozoides con alelo t en comparación con aquellos portadores de los alelos T o + (Handel, 1987). En esta especie los genes causantes del TRD no están ligados al sexo por lo que no ejercen una influencia marcada sobre la psn.

En *Drosophila melanogaster* también está presente un locus distorsionador (Sd) y un locus de respuesta (Rsp). En la mosca de la fruta, locus diferentes de Sd y Rsp, y que también tienen que ver con TRD, están ligados al sexo y podemos encontrar poblaciones que producen descendencia de alguno de los sexos en forma predominante (Honenpoken, 1981). Mediante una translocación del locus Sd al cromosoma Y en *Drosophila*, Lyttle, (citado por Honenpoken, 1981) controló exitosamente poblaciones experimentales de *Drosophila*. Estos machos produjeron descendencia masculina exclusivamente, provocando una desviación radical de la psn a tal grado que la población se extinguió en 7 generaciones.

**Hipotesis.** En caso de existir animales domésticos con locus que provoquen el fenómeno TRD o que sean ligados al sexo, sería factible controlar la psn en forma permanente por medio de la selección de estos animales. Si estos locus no fueran ligados al sexo como el caso del ratón, sería necesario provocar una translocación al cromosoma Y artificialmente. Aun si no existe un fenómeno análogo en los animales domésticos, otra posibilidad es la transferencia de estos genes del ratón a algún animal de interés biotécnico. La translocación o la transferencia de genes en animales son técnicas muy recientes e ineficientes (pags. 85-87), particularmente con los genes TRD que, como ya vimos, tienen varios efectos indeseables. Por tanto, la creación de sementales con TRD ligada al sexo, en caso de ser factible, requiere de mucha investigación.



## 5.5 REVERSION SEXUAL

La reversion sexual en mamíferos, también llamada inversión sexual o intersexualidad, es el fenómeno en el cual un individuo con cromosomas sexuales para un sexo se desarrolla en mayor o menor grado como del sexo opuesto, siendo muy frecuentes los individuos que presentan características de ambos sexos. Por ejemplo, un embrión de mamífero con cromosomas sexuales XY que se desarrolle como hembra y con ovocitos como gonadas.

Del párrafo anterior se desprenden dos términos. La determinación sexual, que corresponde al sexo cromosómico y, la diferenciación sexual, que corresponde al sexo fenotípico. La diferenciación sexual se puede dividir a su vez en diferenciación sexual primaria o gonadal y diferenciación sexual secundaria o corporal. Además, se puede hablar también de un sexo hormonal y de un sexo psíquico (McLusky y Nattolin, 1981; Ottinger, 1989).

Aunque en los mamíferos la reversion sexual es un evento patológico, en especies menos evolucionadas, como reptiles y peces, es un evento más bien adaptativo. Se sabe que en especies inferiores la reversion sexual puede ser completa y relativamente sencilla de producirse natural o artificialmente por influencia de factores ambientales físicos (temperatura) o químicos (hormonas). En algunas especies de lagartijas y tortugas, la diferenciación sexual depende de la temperatura a la que sean incubados los huevos (Bull et al., 1988; Merchant-Larios et al., 1989; Merchant-Larios y Villaipando, 1990). Se puede inferir, entonces que, en estas especies, los genes de la diferenciación sexual están presentes por igual en todos los embriones distribuidos en un par o más de sus cromosomas homólogos. Excepcionalmente a los mamíferos placentados, en los sistemas de determinación sexual XY/XX la diferenciación testicular está dada por los andrógenos y, en el sistema ZZ/ZW, la diferenciación ovárica es inducida por los estrógenos. En estas especies, la reversion sexual (inclusive completa) puede ser inducida con estas hormonas (Wolff, 1988) y, su puede decir que la determinación sexual es más bien ambiental que cromosómica (genética).

En los mamíferos placentados los esteroides sexuales carecen de efecto en la gonadogénesis primaria (Wolff, 1988). La influencia de las hormonas sexuales esteroides en la diferenciación sexual parece ser menor entre más evolucionada sea la especie, siendo importancia a factores de tipo genético. Es decir, a la presencia de genes desconocidos por ahora diferentes de los que codifican para las enzimas que intervienen en la síntesis de andrógenos o estrógenos y que al expresarse activan la diferenciación sexual.

Estudios de individuos con reversión sexual en humanos (Page et al., 1987; Scherer et al., 1989) y en ratones (Cattanach, 1987; Eicher, 1988), señalan el intercambio (translocación) de ciertas porciones del cromosoma Y al X (en machos XX) o la pérdida de esas porciones (en hembras XY) coincidiendo con la hipótesis de que, en mamíferos, es el cromosoma Y el que lleva la información para la diferenciación sexual del macho.

Se puede decir que existen 2 tipos de reversión sexual:

- Aquella que no depende de anomalías genéticas y que puede ser completa, fácil de ser inducida natural o artificialmente, los individuos resultantes pueden ser fértiles, es importante como mecanismo de adaptación, y sólo se conoce en especies inferiores.

- Otra en la cual se presenta translocación o pérdida de ciertos genes, siempre incompleta, los individuos que resultan de ella son infértiles o estériles, y, aparentemente, es la única que se da en mamíferos (salvo rarísimas excepciones, ver abajo).

Para efectos de este trabajo llamaremos a la primera reversión sexual funcional o fisiológica y a la segunda reversión sexual genética o patológica.

Partiendo de los conceptos anteriores, se intuye que la reversión sexual inducida artificialmente en animales de interés zootécnico puede intentarse por dos medios: 1) la utilización de sustancias que activen la diferenciación sexual (reversión sexual inducida hormonalmente); y 2) la transferencia de los genes determinantes del sexo de uno a otro cromosoma y o su delección (reversión sexual inducida genéticamente).

Para intentar una reversión sexual de cualquier tipo en animales superiores, es necesario antes resolver interrogantes de tipo genético e interrogantes de tipo fisiológico, como: ¿cuál es o, más probablemente, cuáles son los genes determinantes del sexo, donde están localizados dentro del genoma y cuál es la relación entre ellos?; ¿existe un gen único que active todo el proceso?; ¿en qué momento, dentro del desarrollo embrionario, comienza la expresión de ese (esos) gene (s) y, por tanto, la diferenciación sexual?; ¿cuál es o cuáles son los productos de ese (esos) gene (s) y a qué nivel actúa (n)?; ¿existe, en los mamíferos una etapa en la que, aunque ya se haya iniciado la diferenciación sexual, esta pueda revertirse completamente sin consecuencias patológicas?

La reversión sexual inducida genéticamente y las interrogantes más íntimamente relacionadas con esta se tratarán dentro del inciso de animales transgénicos. A continuación se exponen las hipótesis sobre como inducir la reversión sexual por medios hormonales.

## Reversión sexual inducida humoralmente

Hipotesis. En 1974, Beatty propone la reversión sexual de embriones XX para crear machos'' en cuya espermatogénesis solo sean producidos espermatozoides X, así la descendencia de estos machos sería siempre del sexo femenino. La reversión sexual que Beatty propone es del tipo fisiológico y para lograrlo se requiere de una sustancia que provoque el inicio de la diferenciación sexual masculina. Como se señaló anteriormente, parece que (salvo raras excepciones; Lovell-Badge y Robertson, y Fregda *et al.*, citados por Burgoyne, 1988) este tipo de reversión sexual no se da en forma natural en especies superiores y, por el momento, es imposible de lograrse a nivel artificial.

El conocimiento exacto de los eventos morfológicos y bioquímicos que se presentan durante la diferenciación sexual son básicos para la búsqueda de aquella(s) sustancia(s) que active(n) este proceso; sustancia (s) cuya utilización en etapas tempranas de la diferenciación sexual podría (n) servir para inducir la reversión sexual completa en mamíferos.

## Diferenciación sexual

El dogma central del desarrollo sexual es aquel formulado por Jost (citado por Wilson, 1989), en base a sus estudios en mamíferos y dice: La diferenciación sexual es un proceso secuencial, ordenado y relativamente directo. El sexo cromosómico (o genético), establecido al momento de la concepción, dirige el desarrollo ya sea de los ovarios o de los testículos. Si se desarrollan los testículos, sus secreciones hormonales provocan el desarrollo de características sexuales secundarias masculinas, conocidas en conjunto como genotipo masculino. Si un ovario se desarrolla, o si ninguna gónada está presente, el desarrollo anatómico es del tipo femenino''.

Las afirmaciones de Jost, establecen una de las principales características de la diferenciación sexual en mamíferos. Esto es que el sexo femenino es constitutivo y el masculino es inductivo. Es decir, con la secreción hormonal de la gónada femenina o aún sin gónada alguna, el individuo se desarrolla como hembra. Por el contrario, sólo en el caso de secreción hormonal de la gónada masculina el individuo se desarrolla como macho al inhibir, estas secreciones, el desarrollo de órganos femeninos. Curiosamente, en aves y reptiles, entre otros, el sexo inductivo parece ser el femenino. Es por esto que tradicionalmente se ha tomado a la diferenciación gonadal como el primer indicio de (la clave para entender) la diferenciación sexual.

Diferenciación gonadal. Bioquímicamente hablando, el primer indicio del que se tiene conocimiento sobre la diferenciación gonadal es la producción de hormona antimülleriana por las células de Sertoli. Poco después, las células de Leydig comienzan a producir la testosterona (Vigier *et al.*, 1987; Wilson, 1989; Wilson *et al.*, 1981). Siendo las células de Sertoli células

típicas de la gonada masculina, el inicio de la diferenciación sexual debe ser buscado en eventos morfológicos y bioquímicos anteriores a la producción de la hormona antimülleriana.

En estudios citogenéticos de testículos de ratones quiméricos XY/XX, Burgoyne et al. (1988), comprobaron que las células de Sertoli son exclusivamente XY a diferencia de las células de Leydig, células peritubulares y células del tejido conectivo, algunas de las cuales presentan cromosomas sexuales XX. Esto sugiere que además de ser típicamente masculinas, las células de Sertoli son las primeras o de las primeras en diferenciarse y en expresar los genes que activan la diferenciación sexual (Burgoyne, 1988).

Los estudios histológicos de Taketo et al. (1984, 1985), ponen en serria duda las afirmaciones anteriores. Al transplantar primordios ováricos tetales (gonada indiferenciada) de ratón a ratones machos adultos, el microambiente masculino provocó reversión sexual de la gonada (en algunos casos completa). El estudio histológico de los ovotestis mostraron 3 zonas típicas de diferenciación: una zona diferenciada principalmente como tejido ovárico, otra como tejido testicular y otra de transición entre las 2 anteriores. Las células pregranulosas de la parte ovárica y las de Sertoli de la testicular parecen estar unidas por células intermedias que a su vez se originaron de las primeras (las pregranulosas). De ser así, las de Sertoli también se abrían originado de las células pregranulosas y, por tanto, deben mostrar cromosomas sexuales XX al análisis citogenético.

Aun más importante, y que dejan en segundo plano las dudas sobre si las células de Sertoli son las primeras en diferenciarse y las dudas sobre su constitución cromosómica sexual, es el hallazgo de que las espermatogonias nunca son XX. En los estudios de Taketo et al. (1984), las ovogonias presentes en la porción ovárica de los ovotestis, degeneraban hacia la zona de transición y el tejido testicular carecía de espermatogonias. En humanos varones XX, fenotípicamente normales, pueden presentar testículos con células de Sertoli y células de Leydig pero sin espermatogonia alguna (Palmer et al., 1989).

Estos hallazgos ponen en jaque la hipótesis de Beatty ya que el fin último de la diferenciación gonadal es la producción de gametos viables necesarios para la reproducción. Además, indican que la diferenciación gonadal debe ser entendida como diferenciación gonadal de células somáticas (células de Sertoli, células de Leydig y células del parénquima gonadal) y diferenciación gonadal de células germinales (Burgoyne, 1988). Eventos que, aunque íntimamente relacionados, tal vez sean independientes en ciertas etapas del desarrollo, por ejemplo:

- Supongamos que las células germinales primordiales hayan iniciado su diferenciación sexual durante la migración a la cresta genital (diferenciación a tal grado mínima que resulta imposible con las técnicas actuales detectar tales campos). Al llegar a la cresta genital estas células continuarían con su diferenciación y, a su vez, promoverían la diferenciación gonadal somática. En cierto punto de su diferenciación las células germinales podrían alcanzar tal especialización que las

niciese dependientes de células contiguas (como las espermatogonias de las células de Sertoli).

- Otra posibilidad podría ser, que se activaran otros genes que actúen internamente y que sean necesarios para que las células germinales continúen con su diferenciación y especialización. De esta manera, los pacientes 46 XX machos, con testículos bien diferenciados pero sin espermatogonias, podrían poseer genes translocados del cromosoma Y al cromosoma X paterno, encargados de las primeras etapas de la diferenciación de las células germinales y/o genes que se encarguen exclusivamente de la diferenciación gonadal somática. Explicándose así la existencia de pacientes con reversión sexual cuya única anomalía fenotípica sea la carencia de células germinales.

### El proceso de la diferenciación sexual visto desde otros ángulos.

Otras hipótesis sobre la diferenciación sexual, radicalmente distintas a los conceptos anteriores, son las referentes a tejido extragonadal o a diferentes tasas de desarrollo embrionario como activadores de la diferenciación gonadal.

Activación de la diferenciación sexual en tejidos extragonadales.  
En la tortuga Lepidochelys olivacea, en la que la determinación sexual es térmica y no cromosómica, parece ser que el efecto de la temperatura actúa indirectamente sobre la gónada al activar previamente algún otro órgano o tejido (posiblemente de origen nervioso). Merchant *et al.* (1989), y Merchant y Villalpando (1990) llegaron a tal conclusión al incubar gónadas indiferenciadas de esta especie dividiéndolas en 2 grupos sometidos a diferentes temperaturas, 28 grados centígrados (grupo A) y 32 grados centígrados (grupo B). Temperaturas a las que normalmente se desarrollan machos y hembras, respectivamente. Justo después del momento en el que se sabe inicia la diferenciación gonadal en esta especie, la temperatura de incubación fue invertida (32 grados para el grupo A y 28 grados para el grupo B). Al analizar histológicamente las gónadas en diferenciación a diferentes intervalos después de haber invertido la temperatura, no encontraron indicios de reversión sexual. En cambio, cuando las gónadas no fueron extirpadas y se incubaron como parte del embrión, en muchos de los casos se presentó reversión sexual después de invertir la temperatura de cultivo. Posiblemente por influencia de algún órgano diferente del gonadal o por influencia de células gonadales somáticas (v.gr. células vasculares o células nerviosas) que hasta ahora no se les haya dado importancia en la diferenciación gonadal. En este segundo experimento, el que se diera la reversión sexual o no de la gónada, parece haber dependido de la edad (grado de desarrollo y diferenciación) del embrión y de la gónada al momento de invertir la temperatura.

O et al. (1988), encontraron que el dimorfismo sexual en el marsupial *Macropus eugenii* es detectable en estructuras extragonadales (bolsa escrotal en el macho y primordios mamarios en las hembras) cuando aun no hay diferenciación morfológica o bioquímica alguna de las gónadas.

Tasas de desarrollo embrionario y dimorfismo sexual. Bajo esta hipótesis se analiza al dimorfismo sexual como producto de diferentes tasas de desarrollo (Mittwoch, 1989), tanto entre los embriones de diferente constitución cromosómica sexual, como en los embriones de especies que carecen de cromosomas sexuales. En los reptiles en los que el sexo inductivo es el femenino, y en aves, los ovarios son las primeras gónadas en diferenciarse. Al contrario, en mamíferos, cuyo sexo inductivo es el masculino, los primordios testiculares son detectables algun tiempo antes que los primordios ovaricos en embriones de la misma edad (Merchant-Larios y Villaipando, 1990; Merchant-Larios et al., 1989; Mittwoch, 1989; Taketo et al., 1984). Es más, aún en etapas en las que no es detectable la diferenciación gonadal a nivel morfológico, las gónadas de mayor desarrollo (peso y tamaño) corresponden a las del sexo inductivo (Mittwoch, 1989).

Tsunoda et al. (1985), estudiando embriones de ratón, y Avery et al. (1989a,b), con embriones de bovino, observaron que existen diferentes tasas de desarrollo entre embriones de la misma edad. Al clasificarlos en grupos según la velocidad de desarrollo descubrieron, al análisis citogenético, que el grupo de desarrollo más lento son en su mayoría hembras y lo contrario para el grupo de más rápido desarrollo. Estos embriones se encontraban en etapas de morula temprana a blastocisto tardío, que corresponden a etapas días (ratones) y semanas (bovinos) previas a la diferenciación gonadal en estas especies.

**Conclusión.** Se puede concluir que, cronológicamente hablando, la búsqueda del producto o factor natural que activa la diferenciación sexual debe hacerse desde etapas poco posteriores a la fertilización y no hasta el momento en que se producen los primeros eventos de la diferenciación gonadal. Aun y cuando este producto o factor sea encontrado, es muy probable que el cromosoma Y del mamífero contenga genes esenciales para la espermatogénesis, genes de los que al parecer carece el cromosoma X. Esto complicaría aún más la inducción de la reversión sexual funcional en mamíferos al grado de parecer imposible encontrar la solución.

## 5.6 ANIMALES TRANSGÉNICOS

La transferencia de genes consiste en aislar genes de un animal, clonarlos, modificarlos en el laboratorio y transferirlos a otro animal de la misma o de diferente especie (Land y Wilmut, 1987). El ratón, conejo, cerdo, oveja, y vaca son las principales especies animales en las que se ha intentado la producción de animales transgénicos. De estas, el ratón es la especie en la que mejores resultados se han obtenido y de la que más se ha aprendido sobre este campo.

Además de ser importantísimo material de investigación, hay razones prácticas de tipo clínico y zootécnico para la creación de animales transgénicos. Entre las razones clínicas está la producción (más económica y eficiente) de sustancias terapéuticas como la insulina humana y el factor IX de la coagulación. Entre las razones zootécnicas tenemos la transferencia de genes que aumenten la velocidad de crecimiento, la producción de lana y la producción de leche o que hagan variar la composición de la leche (Land y Wilmut, 1987; Renard y Babinet, 1987; Wilmut *et al.*, 1990).

La tecnología de transferencia de genes gira, principalmente, alrededor de los conocimientos sobre el control de la expresión génica, por lo que a continuación se mencionan importantes aspectos sobre la misma.

### Control de la expresión génica

La evidencia última de la expresión de un gene es la presencia, intra o extracelular, del producto para el que codifica ese gene. Este producto debe presentar dos características: ser de naturaleza proteica (proteína estructural o enzimática) y ser funcional. Para que se sintetice un producto de estas características la célula realiza una serie de pasos, cada uno de los cuales es susceptible de ser regulado, y van desde la transcripción del DNA a RNA, hasta la modificación enzimática de preproteínas. En total son 6 pasos a los que puede ser regulada la expresión génica, el primero y más importante es el transcripcional (Alberts *et al.*, 1989).

Existen 2 tipos de secuencias reguladoras en el DNA que influyen en cuando y cuanto se transcribe de un gene. Estas llevan los nombres genéricos de secuencias promotoras y secuencias amplificadoras. Las secuencias promotoras se localizan a unos cuantos nucleótidos (decenas o centenas) anteriores al sitio donde inicia la transcripción del gene (extremo 5'). Las

amplificadoras, por el contrario, es común que se encuentran a cientos, miles o inclusive, decenas de miles de bases del gene al que regulan. Las secuencias amplificadoras se pueden localizar tanto anteriormente al extremo 5' como después del extremo 3' del gene.

Las secuencias reguladoras son receptoras de substancias, generalmente de naturaleza proteica (proteínas reguladoras), que en conjunto indican'' cuanto es lo que se transmite del gene. Estas secuencias reguladoras pueden aumentar 1000 o más veces lo que se transmitiría del gene al que regulan en caso de que careciera de estas secuencias.

Una misma secuencia reguladora puede presentar varios sitios de unión para diferentes tipos de proteínas reguladoras. Dependiendo de las proteínas reguladoras unidas a las secuencias promotora y amplificadora, una proteína reguladora que recién se añade puede ejercer efectos completamente contrarios. Gracias a esto, pequeñas variaciones en el microambiente permiten la diferenciación celular en la etapa embrionaria, y/o la expresión de genes tejido específicos en etapas posteriores del desarrollo (Alberts et al., 1989).

#### Producción de animales transgénicos

Características, utilidad y medios para transferir los transgenes. Debido a que la magnitud de un transgene debe guardar ciertas proporciones, las secuencias reguladoras más utilizadas para su creación son las de tipo promotor. Comúnmente, un transgene esta formado de un gene y su promotor, propios de la especie, y de un gene (sin secuencias reguladoras) de la misma o de otra especie. En otras palabras es un gene híbrido intra o interespecie.

Un transgene intraespecie puede utilizarse para que cierta substancia de efectos deseables y producida normalmente a bajas dosis por un órgano específico, sea producida por otros órganos además del natural, aumentando así la dosis (y el efecto) general sintetizada por un individuo. Un transgene interespecie puede utilizarse para que una especie sintetice productos de otra especie (v. gr., insulina humana producida en la glándula mamaria de la vaca).

Los transgenes pueden ser transferidos a un animal por tres procedimientos: microinyección de los transgenes a alguno de los pronúcleos del cigoto; infección por retrovirus transgénicos, o al trasplante de células pluripotenciales de diastocito transgénico a otro embrión (Land y Wilmut, 1987; Renard y Babinet, 1987). Otro método muy prometedor, es la utilización de espermatozoides incubados con transgenes en solución (los cuales son absorbidos por las células espermáticas) para fertilización in vitro (Lavitrano et al., 1989). Este último método aún no tiene aceptación general ya que el éxito obtenido por los investigadores que lo reportaron originalmente, no ha podido ser repetido por otros investigadores en otros laboratorios (Brinster et al., 1989).



La eficiencia en la creación de animales transgénicos es muy baja, del orden del 2% en ratones (Renard y Babinet, 1987) y del 1% en animales domésticos (Wilmot et al., 1989); siendo los principales problemas la integración del transgene al genoma y la variabilidad de expresión de los transgenes ya integrados. Esta ineficiencia hace de la producción de animales transgénicos un proceso costoso al inicio (primera generación). A pesar de ello, es una tecnología de gran futuro ya que son caracteres heredables por lo que la crianza de las siguientes camadas (generaciones) de animales transgénicos podrían no costar más que lo que cuesta mantener una camada no transgénica.

En este trabajo se mencionan dos posibilidades para crear animales transgénicos cuya descendencia muestre variabilidad significativa, controlable y heredable de la psn: la transferencia de los genes TRD (pag. 77) o la transferencia del gene activador de la diferenciación sexual (reversión sexual inducida genéticamente).

#### Reversión sexual inducida genéticamente

Hay muchas razones para creer que existe una influencia básica de tipo genético en la determinación y diferenciación sexuales. La creencia de que el gene que activa este proceso es el mismo que inicia la diferenciación testicular tiene un sin número de adeptos (Burgoyne, 1989; Page et al., 1987). Teóricamente, al producto de este gene se le ha dado en llamar factor de determinación testicular o TDF (por sus siglas en inglés). Pero, debido a que las secuencias que se les ha atribuido el carácter de codificar para el TDF (entre ellas la ZFY) no han convencido a la comunidad científica en general (Craig, 1990; Koopman et al., 1988), y a que existen hipótesis en las que se atribuye a genes distintos del TDF el papel de iniciadores de la diferenciación sexual (Mittwoch, 1989), en este trabajo llamaremos gene activador de la diferenciación sexual (gads) al gene (o genes) cuya expresión inicia este proceso. De esta manera, evitamos encasillar a estas secuencias en una función específica que, aun y cuando sean parte importante en el proceso de diferenciación sexual (como la diferenciación testicular), pueden no ser las mismas que inician todo el proceso.

#### Producción del transgene inductor de la reversión sexual fisiológica (hipotesis).

Suponiendo que el cromosoma Y sea el portador del gads, la reversión sexual podría inducirse artificialmente al transferir esta secuencia a cualquier otro cromosoma, de preferencia al X. Para que la incidencia de esta reversión sexual diera radicalmente de la que se produce en forma natural, sería necesario unir (a nivel laboratorio) las secuencias del gads (sin su parte reguladora, gene A) y algún otro gene que conserve sus secuencias reguladoras (gene B) y cuya expresión se vea

favorecida por una substancia normalmente ausente del ambiente uterino. Así, los embriones transgénicos nembras, podrían ser revertidos sexualmente con el simple hecho de incubar a los embriones en un medio rico en esta substancia (hipotética aun) previamente a su transferencia y/o instilando esta substancia en el útero en un momento clave del desarrollo embrionario.

Los problemas y dudas en cuanto a esta hipótesis (además de los problemas inherentes a la creación de animales transgénicos) son:

- No se sabe aun cual es el gads y el momento exacto en que se inicia su expresión (Craig, 1990; Koopman et al., 1988; Palmer et al., 1989; Sneider-Gadicke et al., 1989).

- Es muy posible que sean indispensables otros genes, además del gads, en etapas posteriores del proceso de la diferenciación sexual y/o que afecten la fisiología reproductiva del animal adulto y que no sean compartidos por igual en ambos sexos (genes de la espermatogénesis presentes sólo en el cromosoma Y; Burgoyne 1987, 1988; Burgoyne et al., 1986).

- Ni el sustrato que favorece la expresión del gene asociado al gads, ni sus productos, deben ser tóxicos para el embrión o para la hembra.

Cual es y donde se localiza el gads. El gene TDF es el principal candidato a ser el gads. En 1987 Page et al., haciendo estudios de pacientes humanos con problemas de reversión sexual, encontraron una secuencia frecuentemente translocada del cromosoma Y al X o a algun autosoma (en los varones XX) o ausente en el genoma por deleción en el cromosoma Y (en mujeres XY). Esta secuencia fue llamada ZFY, se localiza en la porción distal del brazo corto del cromosoma Y y se sospecha que corresponde al gene TDF. Además esta secuencia codifica para una proteína que, tridimensionalmente, es muy similar a algunas de las proteínas capaces de regular la transcripción del DNA.

En el ratón se ha detectado una secuencia similar con 2 subtracciones llamadas Zry-1 y Zry-2. En esta especie la diferenciación sexual comienza alrededor del día 12.5, pero para el día 10.5 ya se puede detectar el RNAm correspondiente a Zry-1 (el RNAm correspondiente a Zry-2 solo se localizó en testículos de adulto y está asociado al antígeno H-Y; Nagamine et al., 1988). Se descartó que Zry-1 fuera el TDF ya que en ratones con mutación We en los que los testículos, por lo demás normales, carecen de células germinales y no expresan el gene Zry-1 (Koopman et al., 1989). Este y otros hallazgos, han puesto en duda la veracidad de que la secuencia ZFY y el gene TDF sean el mismo. Por ejemplo:

- En el cromosoma X fue identificada una secuencia (ZFX) muy similar a la ZFY (Page et al., 1987). Secuencia que no está incluida en el proceso de inactivación de este cromosoma (pag. 46; Sneider-Gadicke et al., 1989).

- No todos los pacientes con reversión sexual muestran las anomalías cromosómicas arriba señaladas (Craig, 1990).

- La secuencia ZFY también ha sido encontrada en cromosomas autosómicos de mamífero (Sinclair et al., 1988), en aves (mecanismo ZZ/ZW de determinación sexual; Page et al., 1987) y en los reptiles cuyo mecanismo de determinación sexual es cromosómico independiente (Bull et al., 1988).

Como ya se dijo, algunas hipótesis dan al gene TDF un papel esencial y directo en la activación de la diferenciación sexual. Por el contrario, Mittwoch (1989), le confiere al ZFY un papel indirecto dando gran importancia al desarrollo embrionario en relación al tiempo. Es decir, postula que aquellos embriones que alcancen un determinado desarrollo en un momento equis, se diferenciarán sexualmente como machos y, aquellos que no hallan alcanzado tal desarrollo se desarrollarán como hembras.

Burgoyne (1989), concilia las hipótesis anteriores. Atribuye un papel también directo al gene TDF (TDY para Burgoyne) pero a su vez, confiere gran importancia al momento en que se activa este gene. De tal manera que, si este gene se expresa después del momento óptimo, ya no podrá inhibir completamente el desarrollo de la gónada femenina, dando por resultado un individuo sexualmente anormal. Así, entre más tarde se exprese este gene, mayor podría ser el grado de reversión sexual.

La hipótesis de Burgoyne (1989), permite explicar, al menos en parte, la gran gama de patologías de la diferenciación sexual de mamíferos, desde individuos con defectos mínimos como hipospadias, hasta la reversión sexual funcional en ratones XY hembras (Lovell-Badge y Robertson, citados por Burgoyne, 1988). Así mismo, permite la explicación de: porque secuencias génicas a las que se les ha conferido el papel de gads (como la ZFY del humano), pueden estar presentes en individuos cuyo fenotipo sexual es de hembra.

Una tercera característica de esta hipótesis es la de incluir a los genes ZF del humano (ZFX y ZFY) como "coautores" del inicio de la diferenciación sexual en acción conjunta con la secuencia TDY. En este caso los genes ZF actúan, indirectamente, al influir sobre la velocidad de desarrollo embrionario (Mittwoch, 1989) y se le atribuye a la secuencia ZFY mayor efecto que su homóloga ZFX de tal suerte que los individuos con secuencias génicas ZFX + ZFY (cromosomas sexuales XY) se desarrollarían más rápido que los individuos con dos secuencias ZFX (cromosomas sexuales XX). De esta manera los genotipos normales XY, con genes sexuales'' ZFX + ZFY-TDY, darían un individuo con fenotipo masculino normal; y el genotipo normal XX, con genes sexuales'' ZFX + ZFX, darían un fenotipo femenino normal. En cambio, los individuos genéticamente anormales con genes sexuales'' ZFX + ZFX-TDY (el TDY translocado del cromosoma Y al X paterno o a algún autósoma) no darían el fenotipo macho normal ya que TDY se activaría tardíamente gracias a la menor velocidad de desarrollo de estos embriones.

**Conclusión.** Aunque estas hipótesis son muy interesantes, en Dien de la objetividad cabe aclarar que aún se ignora cual es el **gads** y se concluye que, hasta no conocer perfectamente los **mecanismos** (genéticos y fisiológicos) de la determinación y **diferenciación sexuales**, todo intento en producir **reversión sexual funcional** con animales transgénicos tendrá tantas **posibilidades de éxito** como el que juega a la lotería.

**APENDICE**

**M E T O D O S   C O M P L E M E N T A R I O S**

## A METODOS COMPLEMENTARIOS

En este apéndice se tratarán con mayor profundidad técnicas expuestas en capítulos anteriores ya que, debido a la alta confiabilidad de los resultados que se obtienen con ellas, sirven para evaluar a nivel experimental la efectividad de otras técnicas menos confiables pero más prácticas dentro del sexado de esperma y/o de embriones.

### A.1 CARIOTIPO (técnicas de bandedo cromosómico).

El cariotipo es el estudio, para fines clínicos o científicos, de cada uno de los cromosomas de las células de un individuo. Se basa en la identificación y clasificación de los mismos de acuerdo a su morfología, número y al patrón característico de tinción que presentan.

Según la localización del centrómero a lo largo de los cromosomas, se dice que estos pueden ser metacéntricos, si el centrómero se encuentra a la mitad del cromosoma y conforme se aleje hacia alguno de los extremos se denominan submetacéntricos, acrocéntricos o telocéntricos (figura 13). A excepción de los cromosomas metacéntricos, uno de los brazos de cada cromosoma será más corto que el otro llamándoseles brazos p y q, respectivamente. Además de las diferencias de tamaño y forma están las diferencias en tinción. Al ser teñidos, los cromosomas presentan coloración en algunos segmentos en forma interrumpida y característica, por lo que quedan zonas claras y oscuras (bandas) intercaladas. Las zonas que se tienen corresponden a la eucromatina (Kicmore y Sumner 1989). Existen diferentes métodos de tinción, así mismo, son diferentes los patrones de bandedo para un mismo cromosoma. En la figura 14 se observa el tipo de tinción característico del bandedo G en cromosomas de humano.

Esta figura muestra también que la resolución del bandeo es mejor durante la profase tardía (cromátidas derechas) que durante la metafase (cromátidas izquierdas). Esto se manifiesta como un mayor número de bandas y se explica por que en la metafase la compactación cromosómica es mayor y con ello algunas bandas claras, o algunas bandas oscuras, se unen entre sí (Bickmore y Sumner, 1989; Ronne, 1989; Yunis, 1976).

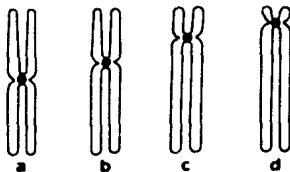


Figura 13. Clasificación de los cromosomas según la localización del centromero: a, metacéntrico; b, submetacéntrico; c, acrocéntrico; y d, telocéntrico. Tomado de Hatzel (1987).

El cariotipo es de gran ayuda para el estudio citogenético tanto a nivel clínico como a nivel investigación. En su inicio, las técnicas de bandeo se emplearon para diferenciar los cromosomas de diferentes especies (Bickmore y Sumner, 1989). Si complementamos estas técnicas con estudios estructurales obtendremos también información de la subestructura y organización cromosómicas (Ronne, 1989). Cuando se estandariza un método y se conoce el patrón de bandas que debe de presentar cada uno de los cromosomas, se puede diagnosticar con bastante precisión si existe alguna aberración cromosómica numérica o estructural (translocación entre cromosomas, deleción de algún segmento, etc).

Técnicas de bandeo. Las técnicas de bandeo más comúnmente utilizadas son: Bando G, Q y R (Trent y Thompson, 1987). Las bandas Q tienen regiones ricas en A-T al igual que el bandeo G, pero en este último caso se deben desnaturar las proteínas previamente a la tinción.

Además, parece ser que las bandas G están relacionadas con regiones de DNA de replicación tardía, las regiones de replicación temprana son G (-). El bandeo R (reversa o Giemsa negativo), al parecer tiene zonas de DNA enriquecidas en G-C ya que para llevar a cabo la técnica requiere de un pretatamiento que desnaturariza el DNA rico en A-T (Bickmore y Sumner, 1989). Existen otras técnicas de bandeo como el bandeo C (para heterocromatina constitutiva), el bandeo NOR (para regiones organizadoras del nucleolo), etc.

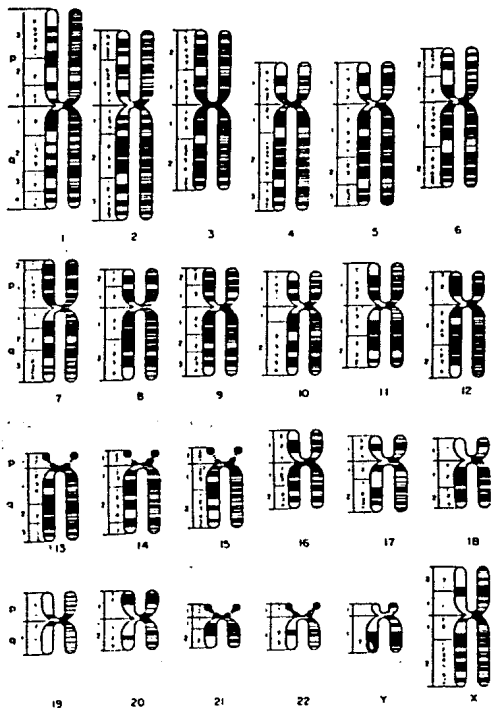


Figura 14. Diferencias en el número de bandas que presentan los cromosomas de humano con la técnica de Bandeo G durante la metafase media (cromátidos izquierdas) y la profase tardía (cromátidos derechos). Tomado de Yunis (1976).

La ejecución de estas técnicas es de escasa dificultad pero la interpretación es muy laboriosa. Un técnico experimentado



puede tardar inclusive semanas en resolver un caso clínico difícil. Afortunadamente, el diagnóstico del sexo mediante la identificación de los cromosomas sexuales al cariotipo no presenta mayores dificultades y el éxito depende básicamente de que las figuras mitóticas sean de buena calidad.

## Metodología

El tener los cromosomas para estudios citogenéticos en forma adecuada solo es posible si se llevan a cabo pasos previos a la tinción propiamente dicha. Los pasos generales son:

- Cultivo celular en los casos que el número de células de la muestra sea escaso (v. gr. biopsia embrionaria).
- Incubación de las células en un medio que contenga algún agente arrestador de la mitosis.
- Incubación de las células en un medio hipotónico.
- Fijación de las células y su transferencia a una laminita, y
- Tinción e interpretación del cariotipo.

**Cultivo celular.** Debido a que no siempre se obtiene un número suficiente de células (y menos de una biopsia embrionaria), es necesario cultivarlas durante varios días (2-10) en un medio al que se le había añadido un agente mitógeno (v. gr. ritohemaglutinina). Así, a pesar del índice mitótico (media = 4%), es factible obtener un número suficiente de núcleos en metatase para la observación de los cromosomas (pags 63-65). El medio de cultivo es especial para cada tipo celular, como el de Chang para cultivo de células de líquido amniótico (Leibo y Rail, 1990) o los medios de Ham F-10, el medio de Earle Modificado (Astiazarán, 1984) y el TCM 199 (Park et al., 1989) para cultivo de embriones.

**Arrestadores del huso mitótico.** Los más comúnmente utilizados son la colchicina y la colcemida. Los cromosomas en la metatase media han alcanzado un alto grado de contracción (condensación) y cuando se utilizan los agentes arrestadores de la mitosis es aun mayor (hipercontracción; Ronne, 1989). El tiempo de exposición de las células a los agentes arrestadores determina en gran parte el grado de contracción que presentarán los cromosomas. El tiempo de exposición requerido al igual que la cantidad del arrestador mitótico es diferente para cada tipo celular. La cantidad de colcemida utilizada es de 0.1 a 1 microgramos para la mayoría de los sistemas celulares. Para obtener cromosomas poco compactados (largos y delgados) en etapas de profase y prometáfase, se requiere un tiempo de exposición corto a una concentración baja (Ronne, 1989). En embriones de una célula, el tiempo de exposición es de 4 hrs y la concentración es de 0.05 micro-gramos/ml (Yoshizawa et al., 1990).

Para reconocer los cromosomas sexuales rápidamente es preferible que la figura mitótica sea arrestada en la etapa de metafase media en la que los cromosomas han sufrido hipercompactación (cromosomas cortos y gruesos; Leibo y Rall, 1990).

En el bovino los cromosomas sexuales X son de los más grandes y metacéntricos o submetacéntricos, mientras que los autosomas son todos acrocéntricos. El cromosoma Y es pequeño y metacéntrico en el Bos taurus y acrocéntrico en el Bos indicus (pags. 62-63; Leibo y Rall 1990; King, 1984).

**Tratamiento hipotónico.** En un medio hipotónico las células absorben líquido y, por tanto, se hinchán, se desintegra el huso mitótico y se pierden las interconexiones cromosomales. De esta manera los cromosomas se separan entre sí haciendo más fácil su identificación al microscopio post-tinción.

Las sales que se utilizan más comúnmente en las soluciones hipotónicas son cloruro de potasio (KCl) y citrato de sodio (Ronne, 1989). El KCl se usa a una concentración de 0.075 M por un tiempo variable (30 minutos a varias horas) según el método (Ronne, 1989; Trent y Thompson, 1987; Yoshizawa, 1990).

**Fijación.** Para el análisis cromosómico las células se fijan comúnmente con una solución de metanol:ácido acético a razón de 3:1. El metanol desnaturaliza y coagula las proteínas, mientras que el ácido acético coagula las nucleoproteínas y provoca hinchamiento celular preservándose así la estructura cromosómica y la separación entre cromosomas (Ronne, 1989). La fijación a lo largo de la noche da mejores resultados (Yunis y Sánchez citados por Ronne, 1989).

**Tinción.** Los colorantes utilizados para cada técnica de bandeado son:

- Giemsa, Giemsa + Wright o Wright-Leishman, para el bandedo G. Antes de teñir las células, se digieren las nucleoproteínas con tripsina (Ronne, 1989; Trent y Thompson, 1987; Yunis, 1976).
- Giemsa o Naranja de Acridina, para bandedo R. Esta técnica requiere de un pretratamiento en el que se incuba la lamina en solución salina caliente (Ronne, 1989; Trent y Thompson, 1987).
- Quinacrina Dinidroclohidrica o Mostaza de Quinacrina, para bandedo Q (Trent y Thompson, 1987).
- Giemsa con pretratamiento de hidróxido de bario (Ba(OH)<sub>2</sub>) para bandedo C (Trent y Thompson, 1987).
- Nitrato de Plata + Giemsa, para bandedo NOR (Trent y Thompson, 1987).

Existen muchas variantes para cada una de las técnicas de bandedo, inclusive para un mismo tejido. A continuación se esquematiza técnica utilizada en el Laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Perinatología en donde utilizan los colorantes de Wright y Giemsa para el bandedo G.

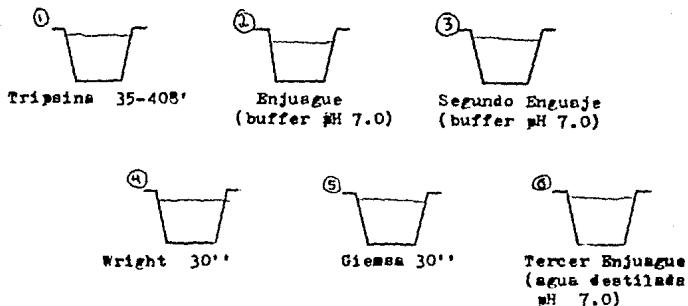


Figura 15. Esquema de la técnica de bandeado G (Laboratorio de Genética, Instituto Nacional de Perinatología, México).

## A.2 CITOMETRIA DE FLUJO Y SEPARACION CELULAR

EL aparato utilizado en esta técnica calcula el contenido de DNA celular, midiendo la fluorescencia emitida por células teñidas con un colorante nuclear fluorescente y excitadas con un rayo láser. Las células son forzadas a fluir una a una al pasar a través de un tubo inyector de escaso diámetro, después de lo cual son excitadas por el rayo láser. El inyector es sometido a un vibrador por lo que la corriente en la que fluyen las células se interrumpe continuando como gotas individuales algunas de las cuales contienen células y otras no. Inmediatamente después de medir la fluorescencia emitida por las células el aparato carga (positiva o negativamente) a cada una de las gotas que contengan alguna célula. Las gotas caen por gravedad y pasan a través de un campo eléctrico, de esta manera son atraídas hacia el cátodo o hacia el ánodo. Se recolectan 3 fracciones, la que corresponde a las gotas cargadas positivamente y atraídas hacia el cátodo, la que corresponde a gotas cargadas negativamente y atraídas hacia el ánodo, y la que corresponde a las gotas que no contienen tipo celular alguno y no son desviadas al pasar por el campo eléctrico (Figura 5, pag. 38; Johnson *et al.*, 1987a).

La adaptación de esta técnica para el sexado espermático ha tenido que ir venciendo diferentes obstáculos entre ellos:

- En un principio las técnicas de tinción requirieron del uso de enzimas proteolíticas para descondensar el núcleo espermático junto con procesos de fijación celular para así poder tenerlo en forma estequiométrica. El tratamiento proteolítico elimina la membrana y citoplasma celulares. Esto hace imposible la utilización del semen tratado en inseminación artificial (Johnson et al., 1987a). Bajo estos procedimientos la pureza de las tracciones recolectadas es superior a 90% (Johnson y Clarke 1988). Con el objeto de disminuir el daño celular y nuclear, las células son sometidas a sonicación (ondas ultrasónicas) por 10 segundos (Johnson et al., 1987b) lo cual permite la tinción del núcleo espermático además de que conserva la capacidad fertilizadora de los espermatozoides microinyectados (Johnson y Clarke, 1988) a pesar de perder la cola.

- Los espermatozoides, a diferencia de la mayoría de las células, tienen un núcleo denso, oval, alargado y aplanado por lo cual la emisión de la fluorescencia puede ser muy variable a menos que todas las células estén dirigidas espacialmente en forma casi idéntica. Esto se puede lograr haciendo fluir las células en una corriente. De esta manera se alinean según su eje longitudinal aunque persiste el problema de la rotación sobre este eje (Garner et al., 1983; Pinkel et al., 1982b). Este obstáculo se libra si los detectores de fluorescencia se colocan a lo largo del eje con respecto a la corriente de flujo (figura 16), o modificando el tubo inyector de tal manera que su orificio de salida esté aplanado (figura 17) para que así la corriente de flujo tenga la apariencia de un listón provocando que la mayoría de los núcleos espermáticos en la suspensión, estén orientados en el mismo plano (Johnson et al., 1987a). Así, se eliminan las diferencias entre la fluorescencia emitida por el borde o por la cara plana del núcleo espermático (Johnson y Clarke, 1988).

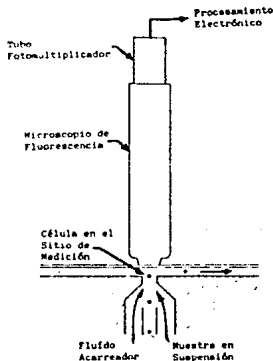


Figura 16. Citómetro de Flujo. En este modelo, el microscopio fluorescente de epi-iluminación se entoca sobre la corriente de flujo. Tomado de Pinkel et al., (1985).

Jonhson et al. (1989), sometieron esperma de conejo intacto (sin ser sometido a los procesos de proteólisis y fijación o al de sonicación) al CSF. Aunque la orientación del núcleo celular dentro de la corriente de flujo no fue tan exacta, lograron obtener fracciones de 86 y 81% de pureza para los espermatozoides X e Y, respectivamente (pag. 37).

## Metodología

A continuación se describe a grandes rasgos el procedimiento de preparación del material biológico (espermatozoides) para su identificación y separación en un CSF, así como ciertas especificaciones de esta técnica. Hay que recordar que, en el caso de que esta técnica se utilice únicamente para comprobar la efectividad de otros métodos que pretenden lograr la separación de espermatozoides X e Y, no importa ni la viabilidad de las células post-análisis ni su separación en 2 poblaciones.

### Preparación celular

Los espermatozoides pueden obtenerse a partir de epididimo, de un eyaculado en fresco, de semen criopreservado o también postratamiento (cuando se quiere comprobar la efectividad de otras técnicas; Garner et al. 1983; Johnson et al., 1987a; Pinkel et al., 1985). El semen se extiende en PBS 10 mM, pH 7.2, a una concentración de 70 millones de espermatozoides por ml. Se lava 2-3 veces en PBS por medio de centrifugación, para eliminar el plasma seminal. En este momento se puede someter a sonicación o a fijación según la técnica a usar (Johnson et al., 1987b). Cuando se somete a sonicación esto se hace hasta que el 95% de los espermatozoides ha perdido la cola (aproximadamente 10 segundos). Para la fijación se resuspende el botón celular resultante de la última centrifugación en 50 microlitros de PBS y se fija mediante la adición gota a gota de 1 ml de etanol al 80% (Johnson et al., 1987b). Para fijar semen criopreservado primero se extiende en citrato de sodio 0.1M y se lava en DMSO-citrato de sodio, pH 7.0, en concentraciones sucesivas de 5, 15, 30 y 50% (Garner et al., 1983).

### Tinción

El esperma sonicado se centrifuga y el botón celular se resuspende en PBS y se tinte con Disbenzimidá (Hoechst 33342). El esperma fijado se centrifuga y resuspende en 500  $\mu$ l de una solución de papaina y Tris-HCl, la digestión se lleva a cabo durante 15 minutos y después se tiñen los núcleos Johnson et al., 1987b).

Otros fluorocromos utilizados para la tinción son 4'-6-diamino-2 fenilindol (DAPI) y ditioeritritol (DTE). Si los espermatozoides se van a utilizar para la inseminación artificial no se someten a sonicación o a los procesos de proteólisis y fijación, simplemente se tiñen con alguno de los colorantes antes citados (Johnson et al., 1989).

### Orientación Celular



Figura 17. Tubo de inyección del citómetro de flujo. Obsérvese lo aplastado del orificio de salida. Tomado de Gledhill (1988).



Figura 18. Histograma en forma de curvas Gaussianas que representan la fluorescencia emitida por los núcleos espermáticos. Tomado de Gledhill (1988).

Especificaciones del aparato. El inyector de corriente de flujo "jet-in-air" (sin traducción literal) es de 76 micrómetros (fig. 17). El rayo láser, perpendicular a la corriente de flujo, excita los núcleos y/o células en los rangos de luz ultravioleta de 351 a 364 nm operando a 150-200 mW. Los detectores de fluorescencia están colocados a 0 y a 90 grados con respecto al haz del láser de tal manera que la fluorescencia emitida por la cara plana de los espermatozoides es recogida por el detector 0 grados, mientras que el detector 90 grados capta la fluorescencia emitida por el borde de la cabeza. Las señales son procesadas por computadora e interpretadas gráficamente como histogramas en forma de curvas Gaussianas (figura 18).

### Separación de cromosomas mediante citometría y separación de flujo.

Los principios son los mismos que para la citometría de flujo y separación celular. El obtener tracciones ricas en un cromosoma individual sirve para crear bibliotecas génicas específicas de ese cromosoma o para hibridación directa y la localización de ciertas secuencias dentro del cromosoma.

Los tipos celulares de humano más comúnmente utilizados como fuente de cromosomas son fibroblastos diploides humanos, linfoblastos e híbridos de células de hamster y humano. La separación de cromosomas por esta técnica puede alcanzar 90 % de pureza. Los cromosomas pueden ser separados a una velocidad de flujo de 1000 a 2000 cromosomas por segundo (Bartholdi *et al.*, 1987).

### A.3 TECNOLOGIA DEL DNA RECOMBINANTE (hibridización del DNA)

Aunque las técnicas de hibridización son las que finalmente se utilizan en el diagnóstico del sexo, se requiere de una serie de pasos previos en los que intervienen otras técnicas pertenecientes a la tecnología del DNA recombinante (de ahí el título de este inciso). De hecho, se puede decir que se llevan a cabo varias pruebas de hibridización antes de la utilizada para el diagnóstico.

Los pasos generales para realizar la hibridización del DNA con fines de diagnóstico sexual son:

- Obtención de fragmentos específicos del cromosoma Y.
- Síntesis de esos fragmentos (sondas).
- Hibridización de los mismos con DNA problema (hibridización diagnóstica; van Vliet et al., 1989).

En la obtención y síntesis de fragmentos específicos del cromosoma Y (van Vliet et al., 1989) se requiere de:

- 1) Aislar el cromosoma Y por medio de citometría y separación de flujo o a partir de híbridos de células somáticas.
- 2) Crear una biblioteca o genoteca de secuencias del cromosoma Y (específicas o no) por medio de la digestión del genoma con endonucleasas de restricción (ver abajo).
- 3) Clonación de secuencias del cromosoma Y.
- 4) Hibridización de estas secuencias con DNA de macho y con DNA de hembra, por separado, con el objeto de identificar secuencias que hibridicen principal o únicamente con el cromosoma Y.
- 5) Clonar estas secuencias y someterlas a digestión enzimática para crear una segunda biblioteca con secuencias específicas del cromosoma Y.
  - a) Hibridización de las secuencias específicas con DNA de macho y con DNA de hembra, por separado, con el objeto de determinar el número de copias dentro del genoma de cada uno de los sexos.

Las secuencias repetitivas del cromosoma Y en un alto número de copias (v. gr. 2000), es frecuente que presenten copias homólogas (en menor número) en autosomas o inclusive en el cromosoma X. Por tanto, presentes tanto en machos como en hembras. De estas secuencias se dice que se encuentran enriquecidas en el genoma macho antes que ser secuencias específicas de macho.

Se puede decir que existen tres técnicas básicas que es preciso llevar a cabo para realizar los pasos mencionados arriba, y son: 1) la digestión enzimática del DNA mediante endonucleasas de restricción y su secuenciación (al menos en parte); 2) la clonación de secuencias de DNA; y, 3) la hibridización del DNA.

## ENZIMAS O ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Para obtener la secuenciación de cualquier porción del genoma se han utilizado una serie de enzimas en su mayoría de origen bacteriano que tienen como característica principal el cortar el DNA en sitios específicos diferentes, reconocidos según la enzima utilizada. Son llamadas así ya que evitan (restringen) la entrada de DNA viral al citoplasma celular (Alberts *et al.*, 1989). La especificidad está dada por la secuencia de bases (4-8) presentes alrededor del sitio de corte (figura 19). Algunas enzimas de restricción son Eco RI (de *E. coli*), Hind II (de *Haemophysalis influenzae*) y Sac II (*Saccharomyces*) y muchas otras (Lindsay *et al.*, 1987). Cada una de ellas tiene diferente manera de cortar el DNA. Las endonucleasas que dejan extremos cohesivos son muy utilizadas para clonación de genes (ver abajo).

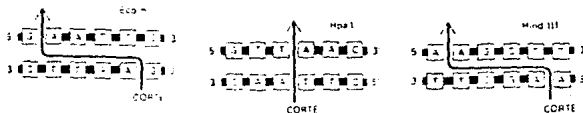


Figura 19. Secuencia de bases alrededor del sitio de corte y tipos de corte del DNA con diferentes endonucleasas de restricción. Tomado de Alberts (1987).

De esta metodología se derivan, de una misma porción de DNA, una serie de fragmentos característicos para cada enzima (fragmentos de restricción de longitud variable, FRLV) con los cuales se pueden crear genotecas de restricción. Para obtener la secuenciación de los FRLV, se clonan y estas clonas se someten a tratamientos químicos en los que sea eliminado parcialmente solo un tipo de nucleótido. Hay un tratamiento para cada tipo de nucleótido. Al someter estos nuevos fragmentos a separación por técnicas electrotóricas se puede obtener la secuenciación de las porciones de DNA que se deseen estudiar (figura V.8).



En resumen, las aplicaciones de la tecnología de endonucleasas de restricción son: interviene en el corte del DNA y su separación en fragmentos, en el mapeo de cromosomas, en el análisis de secuencias nucleotídicas de DNA, en el aislamiento de genes, en el análisis de la organización del DNA de células eucariotas y en la reestructuración y clonación de moléculas de DNA (Alberts et al., 1989; Lindsay et al., 1987).

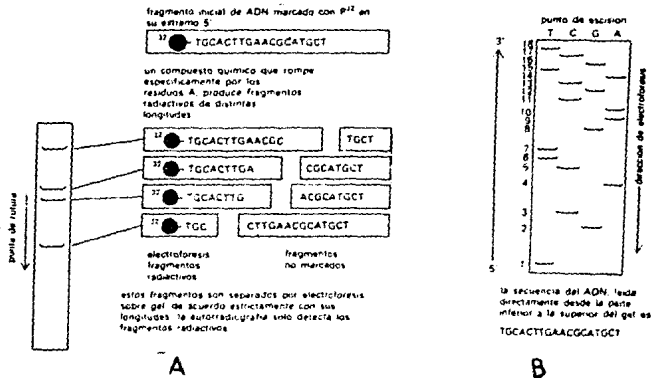


Figura 19. secuenciación de bases en ERLVs mediante electroforesis (b) después de haberlos sometido a tratamientos químicos específicos (a). Tomado de Alberts (1989).

### CLONACION DEL DNA

La clonación es la reproducción genotípica y fenotípicamente idéntica (clon) de un individuo un gran número de veces. En la clonación del DNA se multiplica en un número muy alto, la o las secuencias de DNA deseadas.

Las herramientas biológicas utilizadas como vectores en la clonación del DNA son: el plásmido, el bacteriófago, el cósmido y el YAC (cromosomas levadura-artificiales; apuntes del curso Actualización en Biología Molecular, Hospital General de México, Marzo-Mayo, 1990). Además, se tiene la clonación por medio de

la polimerasa de reacción en cadena (PCR) que es un sistema enzimático *in vitro* que no requiere de organismos biológicos (ver abajo). Los principios de clonación para los vectores biológicos son los mismos. A continuación se describe la clonación del DNA con plásmidos y la clonación mediante la técnica de PCR.

**Plásmido.** El plásmido es DNA de forma circular de doble cadena y de bajo peso molecular separado naturalmente del resto del genoma. Los plásmidos están presentes en células bacterianas, en levaduras y en mamíferos (Alberts, 1989). Son purificados en base a su bajo peso molecular; el DNA cromosómico es sedimentado mediante centrifugación quedando en suspensión los plásmidos.

Para utilizarlos en clonación, el DNA circular del plásmido es seccionado por una enzima de restricción. La endonucleasa debe ser del tipo que deje extremos cohesivos. A sí mismo, el DNA genómico a clonar deberá ser seccionado por el mismo tipo de enzima. De esta manera se puede insertar el DNA problema al plásmido (figura 21).

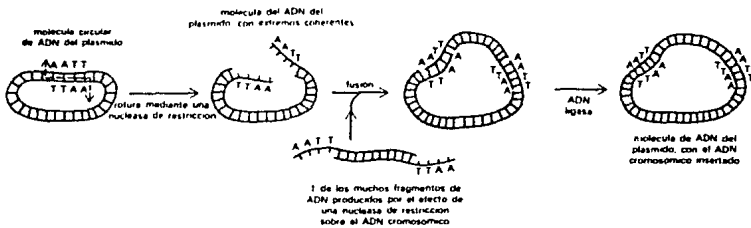


Figura 21. Inserción de DNA heterogéneo al DNA del plásmido. Tomado de Alberts *et al.* (1987).

En la figura 21, se esquematiza como los extremos cohesivos, producidos al digerir diferentes DNA con la misma enzima de restricción, permiten la unión del DNA heterogéneo y el DNA del plásmido.

Los híbridos de DNA del plásmido y el DNA problema, son transferidos a células bacterianas o de levadura para que durante la multiplicación celular sea replicado (clonado) el DNA heterogéneo junto con el DNA de estas células (Alberts *et al.*, 1989). Solamente algunas de las colonias (bacterianas o de levadura) contienen el inserto correspondiente al DNA de interés. A continuación se identifican y aíslan estas colonias para purificar la secuencia problema en cantidad suficiente para su utilización.

**DNA complementario (DNAC).** Los insertos de DNA a ser clonados pueden ser obtenidos mediante una estrategia diferente. Una gran parte del DNA no es transcrito a RNAM para la síntesis proteica y por tanto se dice que corresponde a pseudogenes, muchos de estos pseudogenes son clonados por el procedimiento descrito arriba. Si en lugar de digerir enzimáticamente el DNA genómico y clonar los fragmentos resultantes, se extrae el RNAM celular y se somete a la acción de la RNA transcriptasa (enzima presente en los retrovirus que cataliza la síntesis de DNA a partir de un template de RNA) se obtendrán tantas cadenas de DNA, llamadas DNA complementario (DNAC), como RNAM sea aislado de la célula estudiada. Estos DNAC si corresponden, aunque como una especie de negativo, a la secuencia de aminoácidos de las proteínas producidas por esa célula (Alberts *et al.*, 1989). Las ventajas de obtener insertos por este medio sobre los insertos de DNA genómico son:

- Algunas células se especializan en producir cierto tipo de proteínas y, por tanto, de RNAM particular de esas células en grandes cantidades. De esta manera es fácil obtener DNAC específico de cierto tipo celular.

- El número de insertos que se originan por esta técnica es mucho menor que el obtenido a partir de la digestión del genoma celular total. Con ello, el número de clones será también mucho menor haciendo más fácil la identificación y purificación de las clones de interés.

En la actualidad es materia de especulación cual es el gen determinante del sexo (pag. 88-89) y cual el RNAM transcrito a partir de él, pero en cuanto sean plenamente identificados se podrán hacer sondas de DNAC altamente macho-específicas. Estas sondas servirán, entre otras cosas, tanto para diagnosticar el sexo embrionario como para descubrir el momento exacto en que se activa la diferenciación sexual en el embrión.

**Poliomerasa de reacción en cadena (PCR).** Recientemente fue creado un sistema *in vitro* de clonación del DNA que no requiere de la intervención de células vivas (Saiki *et al.*, 1985). Bajo el sistema de PCR, también conocido como amplificación enzimática dirigida, el DNA problema es replicado en forma similar a como lo hace una célula pero con importantes variantes. Para comprender las diferencias primero analizaremos los principios generales de la replicación del DNA en forma natural (figura 21); estos son:

- Separación de las 2 cadenas de DNA mediante la acción de la DNA helicasa y con ayuda de proteínas desestabilizadoras de la doble hélice.

- Síntesis de RNA primero (ver adajo) por una RNA primasa.

- Síntesis de novo de las cadenas complementarias de DNA por acción de la DNA polimerasa.

- Eliminación del RNA primero y llenado de los espacios resultantes con desoxirribonucleosidos por acción de la DNA polimerasa.

- Sellado y unión de los fragmentos de DNA por una DNA ligasa.

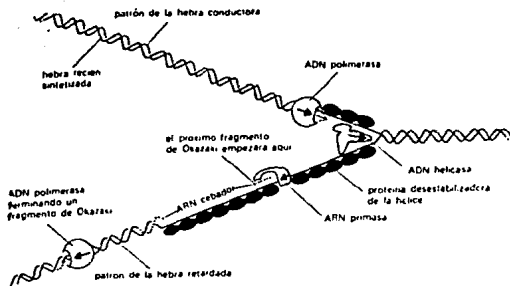


Figura 21. Replicación del DNA en forma natural. Tomado de Alberts et al. (1987).

Las DNA polimerasas son las enzimas encargadas de duplicar el genoma celular mediante la síntesis del DNA. Para ello, requieren de la presencia de un molde de DNA (cada una de las hebras de DNA original) y de una molécula de RNA primer en cada uno de los sitios de síntesis de DNA. En las células vivas la RNA primasa es la encargada de sintetizar la molécula primer de RNA. En la técnica de PCR los primeros corresponden a oligonucleótidos sintetizados in vitro. La secuencia de estos nucleótidos debe ser complementaria a porciones del DNA problema localizadas hacia el extremo 5' de las secuencias que se pretenden amplificar (figura 22) sirviendo así como límites para el DNA clonado (Alberts et al., 1989; Erlich et al., 1988).

En la técnica de PCR la duplicación del DNA se lleva a cabo mediante los siguientes pasos generales:

- 1) El DNA problema es extraído de las células. Esto se puede lograr mediante lisis celular en medios hipotónicos y centrifugación (Weier et al., 1990) o por tratamiento hipotérmico (94 grados centígrados por 30 minutos; Handyside et al., 1989).
- 2) Separación de las 2 cadenas in vitro (desnaturalización del DNA). A diferencia de la replicación natural en la técnica de PCR esto se logra mediante tratamiento térmico (100 grados centígrados) y no por medios enzimáticos (Alberts et al., 1989; Erlich et al., 1988; Saiki et al., 1985).
- 3) Se añaden oligonucleótidos (DNA primer); en exceso después de haber disminuido la temperatura a 65 grados centígrados y se permite la hibridización de estos con secuencias localizadas en el extremo 5' de los fragmentos de DNA a clonar (Alberts et al., 1989; Erlich et al., 1988).
- 4) Se añade DNA polimerasa y los 4' desoxirribonucleótidos trifosfato y se incuban cerca de 5-10 minutos para que sean

sintetizadas las secuencias de DNA corriente abajo'' con respecto a la localización del primero (Alberts et al., 1989; Erlich et al., 1988; Saiki et al., 1988).

5) Si se repite el ciclo a partir de la desnaturalización del DNA, cada nuevo ciclo duplicará el número de copias de la secuencia a clonar con respecto a las existentes al final del ciclo anterior (figura 23). De tal manera que, si se repite por 20-40 o más veces, se puede amplificar una secuencia hasta millones de veces (Alberts et al., 1989; Erlich et al., 1988).

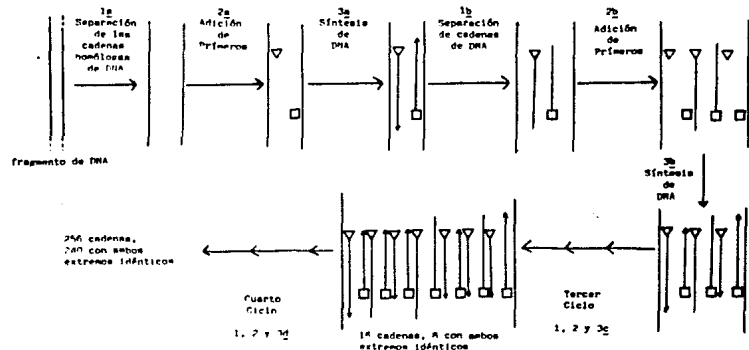


Figura 23. Replicación (clonación) del DNA por la técnica de PCR. Tomado de Alberts et al. (1989).

Debido a que para iniciar un nuevo ciclo el DNA neo-clonado se somete al tratamiento térmico con el fin de desnaturalizarlo, la DNA polimerasa tiene que ser extraída a partir de un organismo termófilo, de lo contrario, es necesario añadir más DNA polimerasa en cada ciclo dificultando la automatización de la técnica. Saiki et al. (1988a), purificaron una DNA polimerasa termoestable de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* que se conoce como Taq polimerasa cuya utilización se ha generalizado en la actualidad.

Para clonar sondas marcadas solo se requiere de añadir nucleótidos marcados radioactivamente, o con algún otro tipo de marcaje, durante el paso 2 ya sea al inicio de la técnica o en alguno de los ciclos siguientes (Weier et al., 1990).

**Utilidad.** La magnitud de la amplificación que se puede lograr con la técnica de PCR, resuelve el problema de la pobre reacción que presentan en la hibridización las secuencias únicas o de bajo

numero de copias. Además, ya que esta técnica es automatizable, la producción de sondas comerciales facilitará el diagnóstico altamente específico tanto del sexo embrionario, como de enfermedades genéticas (Saiki et al., 1985) y enfermedades infecciosas (material genético de microorganismos patógenos), o para la detección temprana de oncogenes activos y análisis de variaciones en secuencias alélicas (Erich et al., 1988).

## HIBRIDIZACION DEL DNA

Esta técnica es llamada así porque que su principal característica es identificar la unión de 2 secuencias complementarias de DNA de diferente origen (una sintética y marcada, y otra natural). La hibridización puede ser llevada a cabo extrayendo el DNA problema de las células estudiadas y exponiéndolo al DNA sintético o aplicando directamente este último sobre las células de un corte histológico (hibridización in situ). Para poder exponer el DNA problema, es necesario transferirlo y fijarlo a papel de nitrocelulosa. La transferencia se puede llevar a cabo mediante varias técnicas, a continuación se explica la técnica de transferencia Southern para luego hablar sobre la hibridización propiamente dicha.

**Transferencia Southern.** En 1975 Southern, hibridiza fragmentos de DNA con sondas radioactivas después de transferirlos a un papel de nitrocelulosa mediante los siguientes pasos:

1) Extracción del DNA. El DNA que se someterá a hibridización se extrae de las células mediante pasos sucesivos en soluciones de cloroformo, fenol e isoamilalcohol. El fenol es un potente solvente orgánico, parcialmente miscible en agua, que elimina las nucleoproteínas. El alcohol precipita los ácidos nucleicos separándolos de otras moléculas en solución.

2) Eliminación de los fragmentos de RNA. El RNA "contaminante" se separa del DNA gracias a su diferente solubilidad en alconoles. El RNA que aún quede se digiere enzimáticamente tratándolo con una RNasa (Alberts et al., 1989).

3) Digestión del DNA problema. Se digiere el DNA problema con enzimas de restricción.

4) Separación y desnaturalización de los fragmentos de longitud variable (FRLV). Los FRLV resultantes (DNA de doble hebra), son separados entre sí mediante electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida y se desnaturalizan mediante tratamiento térmico.

5) Transferencia. Se neutraliza el gel sumergiéndolo en solución buffer a pH7 y se transfiere el DNA contenido en el gel a un papel de nitrocelulosa o de nylon (Alberts et al., 1989).

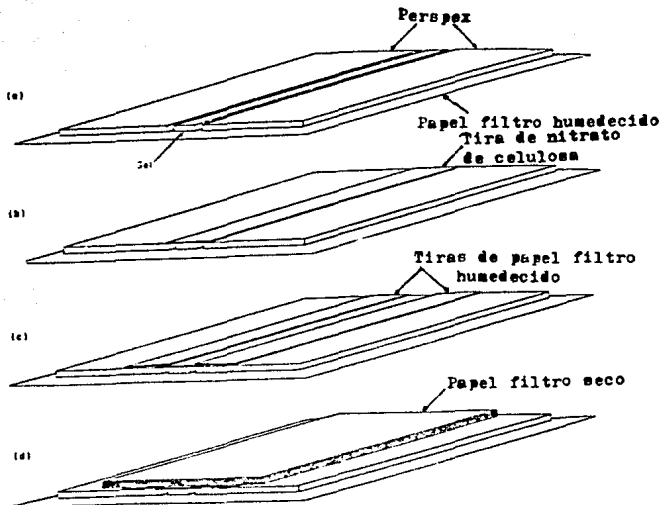


Figura 24. Transferencia de FRLVs a papel filtro por la técnica de Southern. Tomado de Southern (1975).

La transferencia se logra arrastrando el DNA en una solución de SSC (cloruro de sodio 0.015 M y citrato de sodio 0.015 M) que asciende por capilaridad a través del gel hacia el papel de nitrocelulosa (o de nylon) en el cual queda atrapado (figura 24). Una hoja ancha de papel filtro (figura 24a), sumergida previamente en solución SSC, se coloca sobre una superficie impermeable y humedecida con esa misma solución. Sobre el papel filtro se coloca el gel, a cada lado del cual y separado por 2-3mm, esta una hoja de vidrio de material Perspex (del mismo grosor que el gel). Se coloca una tira angosta de papel de nitrocelulosa sobre el gel formando una especie de puentes entre el gel y las hojas de Perspex (figura 24b) y a cada lado del papel de nitrocelulosa, y apenas superlapiándose con él, se colocan 2 tiras de papel filtro del mismo ancho que el de nitrocelulosa (figura 24c). Al igual que la hoja ancha de papel filtro, la tira de nitrocelulosa y las tiras angostas de papel

filtró deberán estar humedecidas con solución SSC. Arriba de todo lo anterior se colocan varias hojas más o menos anchas, gruesas y secas (o también un alfiler de hojas de papel higiénico) con el objeto de que absorban humedad de los estratos interiores (figura 24d). Así, la solución de SSC del papel filtro más interior asciende pasando primero por el gel y disolviendo y acarreado el DNA hacia el papel de nitrocelulosa. El DNA queda atrapado en el papel de nitrocelulosa mientras que la solución SSC continúa su ascenso a través de los demás estratos de papel seco. El tiempo requerido para la transferencia es variable y depende del tamaño de los fragmentos de restricción y, probablemente, de la concentración y grosor del gel (Southern, 1975).

Es necesario fijar el DNA al papel nitrocelulosa, esto se hace calentando el papel de nitrocelulosa a 70-80 grados centígrados por media hora. Se sabe que entre mayor sea la concentración del medio en solución SSC (hasta 10 X SSC), mejor será la retención de los fragmentos de DNA en el papel de nitrocelulosa.

**Hibridización.** Para la hibridización, el papel de nitrocelulosa se humedece con solución de hibridización. Las sondas de DNA disueltas en solución hibridizadora, se vierten sobre el papel de nitrocelulosa y se permite la hibridización a lo largo de la noche. Se lava concienzudamente el papel de nitrocelulosa para eliminar la hibridización inespecífica y se lee el resultado por medios citoquímicos o por autoradiografía, según sea el tipo de marcado de las sondas. En la figura 25, se muestra un esquema, simplificado, de la técnica de hibridización del DNA mediante transferencia Southern.

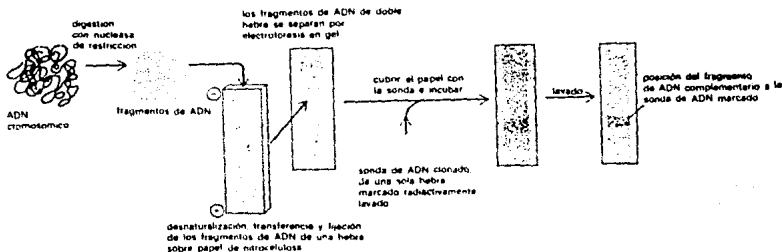


Figura 25. Hibridización del DNA post-transferencia Southern. Tomado de Alberts et al. (1987).

La técnica de hibridización, cuando se utiliza RNAM como material problema, se conoce como transferencia Northern y en ella se utilizan sondas de DNAC (Alberts et al., 1989).



En la hibridización in situ, realizada sobre células en interfase o en división y fijadas a una laminita, la cromatina es sometida a digestión enzimática (proteínasa K, Pinkel et al., 1986) con el fin de que se descondense el núcleo. La hibridización in situ no requiere de la digestión por endonucleasas de restricción.

La técnica de hibridización se ha simplificado transfiriendo directamente el DNA celular desnaturalizado a papel de nitrocelulosa, sin la necesidad de digerirlo con endonucleasas ni someterlo a electroforesis y se conoce como transferencia de punto o "dot blot".

## BIBLIOGRAFIA

- ADLER, D.A., WEST, J.D. and CHAPMAN, V.M.: Expression of alpha-galactosidase in preimplantation mouse embryos. *Nature*, 267: 838-839 (1977).
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERS, K. and WATSON, J.: *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega, Barcelona, 1987.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WATSON, J.: *Molecular Biology of the Cell*. 2nd. edition. Garland Publishing Inc. N Y (1989). pp 180-200, 258-275, 551-612, 866-888.
- ALI, J.I.: Separation of bovine X- from Y-chromosome bearing spermatozoa using monoclonal H-Y antibodies. *ABA* 58(6): 509, abstr. 3453 (1990).
- AMANN, R.P.: Treatment of sperm to predetermine sex. *Theriogenology* 31: 49-60 (1989).
- ANDERSON, G.B.: Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology*, 27 (1): 81-94 (1987).
- ARBIZA, S.I.: *Producción de Caprinos*. AGT editor. México, 1986.
- ASTIAZARAN, J. R.: *Cultivo de embriones de rata en el laboratorio*. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México. México, D. F., 1984.
- AVERY, B. and SHMIDT, M.: Sex determination of bovine embryos using H-Y antibodies. *Acta. Vet. Scand.*, 30: 155-164 (1989).
- AVERY, B., BAK, A. and SHMIDT, M.: Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology*, 32 (1): 139-148 (1989a).
- AVERY, B., SHMIDT, M. and TORBEN, G.: Sex determination of bovine embryos based on embryonic cleavage rates. *Acta. Vet. Scand.*, 30: 147-153 (1989b).
- BALINSKY, B. I. and FARIAN, B.C.: *Introducción a la Embriología*. 5a. edición. Ediciones Omega. Barcelona, 1982.
- BARTHOLDI, M., MEYNE, J., ALBRIGHT, K., LEUDEMANN, M., CAMPBELL, E., CHRITTON, D., DEAVEN, L.L. and SCOTT, C.: Chromosome sorting by flow cytometry. *Methods Enzymol.*, 151: 252-267 (1987).
- BECKETT, T.A., MARTIN, R.H. and HOAR, D.I.: Assessment of the sephadex technique for selection of X-bearing human sperm by analysis of sperm chromosomes, deoxyribonucleic acid and Y-bodies. *Fertil. Steril.*, 52 (5): 829-835 (1989).
- BEATTY, R.A.: Bidipnography (with review) on separation of X and Y spermatozoa. *Bidipny. Reprod.*, 23 (1): 1-4 (1974).
- BEERNINK, F.J. and ERICSSON, R.J.: Male sex preselection through sperm isolation. *Fertil. Steril.*, 38 (4): 493-495 (1982).
- BEERNINK, F.J., ALEXANDER, N., CORSON, S.L., DMOWSKI, W.P. and ERICSSON, R.J.: Male sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertil. Steril.*, Suppl.: 847 (1989).
- BFTTERIDGE, K. J., and FLECHON, J.E.: The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, 29 (1): 155-187 (1988).

- BICKMORE, W.A. and SUMNER, A.T.: Mammalian chromosome banding - an expression of genome organization. *Trends in Genetics*, 5 (5): 144-148 (1989).
- BIRD, E. and CONTRERAS, R.J.: Maternal dietary sodium chloride levels affect the sex ratio in rat litters. *Physiology and Behavior*, 36: 307-310 (1986).
- BONDIOLI, K.R., ELLIS, S.B., PRYOR, J.H., WILLIAMS, M.W. and HARPOLD, M.M.: The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 31 (1): 95-104 (1989).
- BOOMAN, P.: Sexing of bovine preimplantation embryos. *Advances in Animal Breeding. Proceedings of the world symposium in honour of professor R.D. Polittiek, Wageningen, Holanda*, 119-123. Pudoc, Wageningen (1988).
- BOOMAN, P., KRUIJT, L., TIEMAN, M., PIEDRAHITA, J.A., VEERHUIS, R., de BOER, P. and RUCH, F.E.: Production and characterization of monoclonal antibodies against the H-Y antigen. *J. Reprod. Immunol.*, 15: 195-205 (1989).
- BRADLEY, M.P.: Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. *J. Dairy Sci.*, 72: 3372-3380 (1989).
- BRADLEY, M.P., FORRESTER, I.T. and HESLOP, B.F.: Identification of a male specific (H-Y) antigen on the flagellar plasma membrane of ram epididymal spermatozoa. *Hum. Genet.*, 75: 362-367 (1987).
- BRANDRIFF, B.F., GORDON, L.A., HAENDEL, B.S., SINGER, S., MOORE, D.H. and GLEDHILL, B.L.: Sex chromosome ratios determined by karyotypic analysis in albumin-isolated human sperm. *Fertil. Steril.*, 46 (4): 678-685 (1986).
- BRAUN, R.E., BEHRINGER, R.R., PEXCHON, J.J., BRINSTER, R.L. and PALMITER, R.D.: Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 337: 373-376 (1989).
- BRINSTER, R.L., SANDGFEN, E.P., BEHRINGER, R.R. and PALMITER, R.D.: No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 59: 239-241 (1989).
- BRITT, J.S.: Economic and genetic advantages of transferring fresh embryos. *Embryo Transfer*, 3 (1): 4-5 (1988).
- BULL J.J., HILLIS, D.M. and O'STEEN S.: Mammalian ZFY sequences exist in reptiles regardless of sex-determining mechanism. *Science*, 242: 5677-568 (1988).
- BURGOYNE, P.S.: The role of the mammalian Y chromosome during spermatogenesis. *Development* 101 suppl. 133-141 (1987).
- BURGOYNE, P.S.: Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 322: 63-72 (1988).
- BURGOYNE, P.S.: Thumbs down for zinc finger? *Nature*, 342: 860-862 (1989).
- BURGOYNE, P.S., BUEHR, M., KOOPMAN, P., ROSSANT, J. and McLAREN A.: Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX/XY chimaeric mouse testes. *Development*, 102: 443-450 (1988).
- BURGOYNE, P.S., LEVY, E.R. AND McLAREN, A.: Spermatogenic failure in male mice lacking H-Y antigen. *Nature*, 320: 170-172 (1986).

- CAMPBELL, J.R. and LASLEY, J.F.: The Science of Animal that serve Humanity. 3rd. edition. Mc Graw-Hill Book Company. New York, 1985.
- CATTANACH, B.M.: Sex-reversed mice and sex determination., Ann. N.Y. Acad. Sci., 513: 27-39 (1987).
- CLUTTON-BROCK, T.H., ALBON, S.D. and GUINNESS, F.E.: Maternal dominance breeding success and birth sex ratios in red deer. Nature, 308: 358-360 (1984).
- CONCANNON, P.W.: Reproductive physiology and endocrine patterns of the bitch. In Current Veterinary Therapy VII. Small Animal Practice. W.B. Saunders Company. pp. 886-900. Philadelphia (1983).
- CORSON, S.L., BATZER, F.R. and SCHLAFF, S.: Preconceptual female gender selection. Fertii. Sterii., 40 (3): 384-385 (1983).
- CORSON, S.L., BATZER, F.R., ALEXANDER, N.J., SCHLAFF, S. and OTIS, C.: Sex selection by sperm separation and insemination. Fertii. Sterii., 42 (5) 756-760 (1984).
- CORTES, M.G.: Proyección del costo de producción de una pajilla de semen bovino importado a México. Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.
- CRAIG I.: Sex determination: zinc fingers point in the wrong direction. Trends in Genetics, 6 (5): 135-137 (1990).
- CRICHTON, D.N. AND STEEL, C.M.: Serologically detectable H-Y (male) antigen: Mr or Myth? Immunol. Today, 6 (7): 202-203 (1985).
- CHARNOV E.L. and BULL J.J.: The primary sex ratio under environmental sex determination. J. theor. Biol., 139: 431-436 (1989).
- DMOWSKI, W.P., GAYNOR, L., RAO, R., LAWRENCE, M. and SCOMMEGNA, A.: Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. Fertii. Sterii., 31 (1): 52-57 (1979).
- DRIANCOURT, M.A., LORENTZ, R., CHOPIN, R., WEBB, R. and WILMUT, I.: Survival of ovine embryos stored at 4 centigrade degrees for 24 hours. Theriogenology, 30(3): 441-446 (1988).
- EICHER E.M.: Autosomal genes involved in mammalian primary sex determination. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 322: 109-118 (1988).
- ENGELMANN, U., KRASSNIGG, F., SCHATZ, H. and SCHILL, W.: Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. Gamete Res., 19: 151-159 (1988).
- EPSTEIN C.J.: Expression of the mammalian X chromosome before and after fertilization. Science, 175: 1467-1468 (1972).
- EPSTEIN, C.J., SMITH, S., TRAVIS, V. and TUCKER, G.: Both X chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. Nature, 274: 500-503 (1978).
- ERICSSON, R.J., LANGEVIN, C.N. and NISHINO, M.: Isolation of fractions rich in human Y sperm. Nature, 246:421-424 (1973).
- ERLICH, H.A., GELFAND, D.H. and SAIKI, R.K.: Specific DNA amplification. Nature, 331: 451-462 (1988).

- ESCOBOSA, A.: Minerales, vitaminas y aditivos para la dieta de vacas lecheras de alta producción. En Memorias de la 3a. Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero. Holstein de Mexico. Pérez, M., 27-40 (1987).
- FERNANDEZ, H.A., AISEN, E. SABALZA, M.G., CISALE, H., ZANGUITU, J., TRIONFETTI, G. and STEGMAYER, E.: Inseminación artificial con semen sexado. Vet. Arg. III (29): 839-843 (1986a).
- FERNANDEZ, H.A., CISALE, H. and AISEN, E.: Conclusiones de una prueba masiva de I.A. bovina con semen sexado. Vet. Arg. III (30): 1001 (1986b).
- FORSTER, M.S., SMITH, W.D., LEE, W.I., BERGER, R.E., KARP, L.E. and STENCHEVER, M.A.: Selection of human spermatozoa according to their interaction with zona-free hamster eggs. Fertil. Steril., 40 (5): 655-660 (1983).
- FRANCE, J.T., GRAHAM, G.M., GOSLING, R.N. and HAIR, P.I.: A prospective study of the preselection of the sex of offspring by timing intercourse relative to ovulation. Fertil. Steril., 41 (6): 894-900 (1984).
- GARNER, D.L., GLEDHILL, B.L., PINKEL, D., LAKE, S., STEPHENSON, D., VAN DILLA, M.A., AND JOHNSON, L.A.: Quantification of the X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. Biol. Reprod. 28: 312-321 (1983).
- GLEDHILL, B.L.: Control of mammalian sex ratio by sexing sperm. Fertil. Steril., 40:572-574 (1983).
- GLEDHILL, L.B.: Selection and separation of X- and Y- chromosome bearing sperm. Gamete Res., 20: 337-395 (1988).
- GOLDBERG, E.H., BOYSE, E.A., BENNET, D., SHEID, M. and CARSWELL, E.A.; Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. Nature, 232: 478-480 (1971).
- GOLTZ, J.S., GARDNER, T.K., KANOUS, K.S. and LINDEMANN, C.H.B.: The interaction of pH and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on activation of motility in Triton X-100 extracted bull sperm. Biol. Reprod., 39: 1129-1136 (1988).
- GOMENDIO, M., CLUTTON-BROCK, T.H., ALBON, S.D., GUINNESS, F.E. and SIMPSON, M.J.: Mammalian sex ratios and variation in costs of rearing sons and daughters. Nature, 343: 261-262 (1990).
- GOMEZ DE LA CONCHA, E., CATURLA, A. y CHAMORRO.: Tolerancia y autoinmunidad. Medicine, 47: 3021-3032 (1988).
- GOSDEN, J.R., MITCHELL, Q.R., GOSDEN, C.M., RODECH, C.H., and MORSMAN, J.M.: Direct vision chorion biopsy and chromosome specific DNA probe for determination of fetal sex in first trimester prenatal diagnosis. The Lancet, 2: 1418-1419 (1982).
- GRAY, K. R., Freezing Bovine Embryos: a valuable management tool. Embryo Transfer, 3 (1): 4-6 (1988).
- HAFEZ, E.S.E.: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5a. edición. Nueva Editorial Interamericana. Mexico, 1989.
- HANDEL, M.A.: Genetic control of spermatogenesis in mice. Res. Prob. Cell Differ., 15: 1-62 (1987).

- HANDYSIDE, A.H., PENKETH, T.J.A., WINSTON, R.M.L., PATTINSON, J.K., DELHANTY, J.D.A. and TUDDENHAM, E.G.D.: Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 2: 347-349 (1989).
- HAWK, H.W., WALL, R.J. and CONLEY, H.H.: Survival of DNA-injected cow embryos temporarily cultured in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 32 (2): 243-253 (1989).
- HECHT, N.B.: Gene expression during spermatogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 513:90-101 (1987).
- HECHT, N.B.: Haploid gene expression and the regulation of post-meiotic structural genes. In *Development and Function of the Reproductive Organs Vol II: 325-334*. *Serono Symposia Review No. 14* eds. M. Parvinen, I. Huntaniemi and L.J. Pelliniemi (1988).
- HECHT, N.B.: Regulation of haploid expressed genes in male germ cells. *J. Reprod. Fert.*, 88: 679-693 (1990).
- HENSCHEN, T.: Surgical Embryo Transfer. *Embryo Transfer*, 1 (1): 5 (1986).
- HERR, C.M., MATTHAEI, K.I., PIETRZAK, Y. and REED, K.C.: A rapid Y-chromosome detecting ovine embryo sexing assay. *Theriogenology*, 33 (1): 245 (1990a).
- HERR, C.M., MATTHAEI, K.I., STEEL, T. and REED, K.C.: Rapid Y-chromosome assay sexing of peripheral blood lymphocytes from BOVINAE of known phenotypic sex. *Theriogenology*, 33(1): 246 (1990b).
- HERR, K.C., HOLT, N.A., MATTHAEI, K.I. and REED, K.C.: Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome detection assay. *Theriogenology*, 33(1): 247 (1990c).
- HINRICHSEN-KOHANE, A.C., HINRICHSEN, M.J. and SHILL, W.: Analysis of antigen expression on human spermatozoa by means of monoclonal antibodies. *Fertil. Steril.*, 43 (2): 279-285 (1985).
- HOHENBOKEN, W.D.: Possibilities for genetic manipulation of sex ratio in livestock. *J. Anim. Sci.*, 52 (2): 265-277 (1981).
- IIZUKA, R., KANEKO, S., KOBANAWA, K. and KOBAYASHI, T.: Washing and concentration of human semen by Percoll density gradients and its application to AIH. *Arch. And.*, 20(2): 117-124 (1988).
- INIESTRA, J.L. y RICO, N. P.: Aspectos generales y estado actual de la inseminación artificial de ganado bovino Holstein-Friesian en México. Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlan. Universidad Autónoma de México, 1989.
- IWARAKI, S., SHIOYA, Y., MASUDA, H., HANADA, A. and NAKAHARA, T.: Sex ratio of early embryos fertilized in vitro with spermatozoa separated by Percoll. *Theriogenology*, 30 (6): 1191-1198 (1988).
- IYER, S.V., NANDEKAR, T.D. and UMASHASHI, H.C.: Production of H-Y antibody in the ascites fluid of mouse and localization of the antigen on cells and tissues. *Gamete Res.*, 22: 37-49 (1989).
- JABLONKA, E. and LAMB, M.J.: Meiotic pairing constraints and the activity of sex chromosomes. *J. theor. Biol.*, 133: 23-36 (1988).

- JAMES, W.H.: Gonadotrophin and the human secondary sex ratio. *Br. Med. J.*, 281: 711-712 (1980).
- JAMES, W.H.: Time of fertilisation and sex of infants. *Lancet*, 1 (8178): 1124-1126 (1980).
- JAMES, W.H.: Hormonal control of sex ratio. *J. Theor. Biol.*, 118: 427-441 (1986).
- JAMES, W.H.: The human sex ratio. Part 1: a review of the literature. *Hum. Biol.*, 59 (5): 721-752 (1987a).
- JAMES, W.H.: The human sex ratio. Part 2: a hypothesis and a program of research. *Hum. Biol.*, 59 (6): 873-900 (1987b).
- JAMES, W.H.: Hormone levels of parents and sex ratios of offspring. *J. theor. Biol.*, 129: 139-140 (1987c).
- JAMES, W.H.: Testosterone levels, handedness and sex ratio at birth. *J. theor. Biol.*, 133: 261-266 (1988).
- JAMES, W.H.: In vitro fertilisation and sex ratio. *Lancet*, 2 (8660): 1025-1026 (1989).
- JAMES, W.H.: Parental hormone levels ante the possibility of establishing the some mammalian sex ratio variation is adaptive. *J. theor. Biol.*, 140: 39-40 (1989).
- JOHNSON, L.A. and CLARKE, R.N.: Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm: activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes. *Gamete Res.*, 21: 335-343 (1988).
- JOHNSON, L.A. and PINKEL, D.: Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry*, 7: 268-273 (1986).
- JOHNSON, L.A., FLOOK, J.P. and LOOK, M.V.: Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res.*, 17: 293-212 (1987a).
- JOHNSON, L.A., FLOOK, J.P., LOOK, M.V. and PINKEL, D.: Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res.*, 16: 1-9 (1987b).
- JOHNSON, L.A., FLOOK, J.P. and HAWK, W.: Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41: 199-203 (1989).
- KAMEL, F. and KUBAJAK, C.L.: Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroids and mechanism of action. *Endocrinology*, 121 (2): 561-568 (1987).
- KANEKO, S., OSHIO, S., KOBAYASHI, T., IIZUKA, R. and MOHRI, H.: Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124 (3): 950-955 (1984).
- KANEKO, S., OSHIO, S., KOBANAWA, K., KOBAYASHI, T., MOHRI, H. and IIZUKA, R.: Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. *Biol. Reprod.*, 35: 1059-1063 (1986).
- KANEKO, S., OSHIO, S., KOBAYASHI, T., MOHRI, H. and IIZUKA, R.: Buoyancy and sedimentation of human X- and Y-bearing sperm. *Arch. And.*, 18: 45-51 (1987).
- KANEKO, S., YAMAGUCHI, M.D., KOBAYASHI, T. and IIZUKA, R.: Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Fertil. Steril.*, 40 (5):

- 661-665 (1983).
- KING, W.A.: Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21 (1): 7-17 (1984).
- KING, W.A.: Intrinsic embryonic factors that may affect survival after transfer. *Theriogenology*, 23 (1): 161-169 (1985).
- KIRZENBAUM, M., COTINOT, C., LEONARD M., VAIMAN, M. and FELLOUS, M.: Diagnostic du sexe des embryons bovins par biologie moléculaire. *Reprod. Nutr. Dev.*, suppl 1: 125-132 (1990).
- KOD, G.C.: Serology of H-Y antigen. *Hum. Genet.*, 58: 18-20 (1981).
- KOOPMAN, P., GUBBAY, J., COLLIGNON, J. and LOVELL-BADGE, R.: Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature*, 342: 940-942 (1988).
- KRAEMER, D.C.: Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology*, 31(1): 141-148 (1989).
- KRATZER, P.G. and GARTLER, S.M.: HGPRT activity changes in preimplantation mouse embryos. *Nature*, 274: 503-504 (1978).
- KRZANOWSKA, H.: X-Y Chromosome dissociation in mouse strains differing in efficiency of spermatogenesis: Elevated frequency of univalents in pubertal males. *Gamete Res.*, 23:357-365 (1989).
- KRKO, C.J. and GOLDBERG, E.H.: H-Y (male) antigen: detection on eight-cell mouse embryos. *Science*, 193: 1134-1135 (1976).
- LAERO, F. y PAPA, F. Elige el sexo de tu hijo (por el método régimen alimenticio). Editorial Roca. México, D.F. (1984).
- LAND, R.B. and WILMUT, I.: Gene transfer and animal breeding. *Theriogenology*, 27 (1): 169-111180 (1987).
- LAVITRANO, M., CAMALONI, A., FAZIO, V.M., DOLCI, S., FARACE, M.G. and SPADAFORA, C.: Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. *Cell*, 57: 717-723 (1989).
- LEIBO, S.P. and RALL, W.F.: Determination of prenatal sex in cattle by amniocentesis. *Theriogenology*, 27 (1): 246 (1987).
- LEIBO, S.P. and RALL, W.F.: Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. *Theriogenology*, 33 (2): 531-552 (1990).
- LENTON, E.A., SULAIMAN, R., SOBOWALE, O. and COOKE, D.: The human menstrual cycle: plasma concentrations of prolactin, LH, FSH, oestradiol and progesterone in conceiving and non conceiving women. *J. Reprod. Fert.*, 65: 131-139 (1982).
- LEONARD, M., KIRZENBAUM, M., COTINOT, C., CHESNE, P., HEYMAN, Y., SINNAKKE, M.G., BISHOP, C., DELOUIS, C., VAIMAN, M. and FELLOUS, M.: Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. *Theriogenology*, 27(1): 248 (1987).
- LI, H., GYLLENSTEN, U.B., CUI, X., SAIKI, R.K., ERLICH, H.A. and ARNHEIM, N.: Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*, 335: 414-417 (1988).
- LIFSCHYTZ, E. and LINDSLEY, D.L.: The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69 (1): 182-186 (1972).



- LINDSAY, S. and BIRD A.P.: Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA. *Nature*, 327: 336-338 (1987).
- MARTIN, N.G., OLSEN, M.E., THEILE, H., BEAINI, J.L., HANDELSMAN, D. and BHATNAGAR A.S.: Pituitary-ovarian function in mothers who have had two sets of dizygotic twins. *Fertil. Steril.*, 41 (6): 878-880 (1984).
- MARX, J.L.: The cell cycle coming under control. *Science*, 245 (4915): 252-255 (1989).
- McCLURE, R.D., NUNES, L. and TOM, R.: Semen manipulation: improved sperm recovery and function with a two-layer Percoll gradient. *Fertil. Steril.*, 51 (5): 874-877 (1989).
- MCDONALD, L.E., and Pineda, M.H.: *Veterinary Reproduction and Endocrinology*. 4th. edition. Lea and Febiger. Philadelphia, 1989.
- MCDONOUGH.: Letters to the editor. *Comment. Fertil. Steril.*, 47(3): 535-536 (1987).
- MCLUSKY, N. and NAFTOLIN, F.: Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, 211: 1294-1303 (1981).
- McLAREN, A., SIMPSON, E., TOMONARI, K., CHANDLER, P. and HOGG, H.: Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature*, 312: 552-555 (1984).
- MECK, J.M. and GOLDBERG, E.H.: Serological detection of H-Y antigen in humans with a cellular radioimmunoassay and monoclonal antibody. *J. Immunol. Methods*, 73: 293-299 (1984).
- MEIKLE, D.R. and DRICKAMER, L.C.: Food availability and secondary sex ratio variation in wild and laboratory house mice (*MUS MUSCULUS*). *J. Reprod. Fert.*, 78: 587-591 (1986).
- MERCHANT-LARIOS, H. and VILLALPANDO, I.F.: Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: an organ culture study. *J. Exptl. Zool.*, 254: 327-331 (1990).
- MERCHANT-LARIOS, H., VILLALPANDO, I.F. and CENTENO, V.V.: Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetol. Monogr.* 3: 43-61 (1989).
- MITRA, J. and CHOWDHURY, M.: Glycerylphosphorylcholine diesterase activity of uterine fluid in conditions inducing secondary sex ratio change in the rat. *Gamete Res.*, 23: 415-420 (1989).
- MITTWOCH, U.: Sex differentiation in mammals and tempo of Growth: possibilities vs. switches. *J. theor. Biol.*, 137: 445-455 (1989).
- MOHRI, H., OSHIO, S., KANEKO, S., KOBASHI, T., and IIZUKA, R.: Separation and characterization of mammalian X- and Y-bearing sperm. *Dev. G. and Diff.*, 28 (Suppl.): 35-36 (1986).
- MONK, M. and HANDYSIDE A.H.: Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single diastomere. *J. Reprod. Fert.*, 82: 365-368 (1988).
- MONK, M. and KATHURIA, H.: Dosage compensation for an X-linked gene in pre-implantation mouse embryos. *Nature*, 270: 599-601 (1977).
- MOORE, D.H. and GLEDHILL, B.L.: How large should my study be so that I can detect an altered sex ratio?. *Fertil. Steril.*

- 50 (1): 21-25 (1988).
- MORRELL, J.M., KEELER, K.D., NOAKES, D.E., MACKENZIE, N.M. and DRESSER, D.W.: Sexing of sperm by flow cytometry. *Vet. Rec.*, 122: 322-324 (1988).
- MULLER, U., DONLON, T.A., KUNKEL, S.M., LALANDE, M. and LATT, S.A.: Y-190, a DNA probe for the sensitive detection of Y-derived marker chromosomes and mosaicism. *Hum. Genet.*, 75: 109-113 (1987).
- MURRAY, J.D., BOLAND, M.P. and MORAN, C.: Frequency of chromosomal abnormalities in embryos from superovulated Merino ewes. *J. Reprod. Fert.*, 78: 433-437 (1986).
- NAGAMINE C.L., CHAN, K., KOZAK, CH.K. and LAU, Y.: Chromosome mapping and expression of a putative testis-determining gene in mouse. *Science*, 243:80-83 (1989).
- NAGASHIMA, H., KATO, Y., AND OGAWA, S.: Microsurgical dissection of porcine morulae and blastocysts to produce monozygotic twin pregnancy. *Gamete Res.*, 23: 1-9 (1989).
- O, W., SHORT, R.V., RENFREE, M.B. and SHAW, G.: Primary genetic control of somatic sexual differentiation in a mammal. *Nature*, 331: 716-717 (1988).
- OGAWA, S., YAMAHAWA, H., YAMANOI, J., NISHIDA, S., KANO, Y., TAKESHIMA, T., TAUCHI, K. and NAGASHIMA, H.: Are fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common with mammalian species? *Theriogenology*, 29 (5): 1083-1089 (1988).
- OTTINGER, M.A.: Sexual differentiation of neuroendocrine systems and behavior. *Poultry Sci.*, 68: 979-989 (1989).
- PAGE, D.C., MOSHER, R., SIMPSON, E.M., FISCHER, E.M.C., MARDON, G., POLLACK, MCGILLIVRAY, B., CHAPELLE, A., and BROWN, L.G.: The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a ring protein. *Cell*, 51: 1091-1104 (1987).
- PALMER, M.S., SINCLAIR, A.H., BERTA, P., ELLIS, N.A., GOODFELLOW, P.N., ABBAS, N.E. and FELLOUS, M.: Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining gene. *Nature*, 342: 937-939 (1989).
- PARK, C.K., OHGODA, O. and NIWA, K.: Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of carterine and heparin. *J. reprod. Fert.*, 85: 577-582 (1989).
- PEREZ, A., EGER, R., DOMENCHINI, V., KAMBIC, R. and GRAY, R.H.: Sex ratio associated with natural family planning. *Fertil. Steril.*, 43(1): 152-153 (1985).
- PICARD, L., KING, W.A. and BETTERIDGE, K.J.: Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet. Rec.*, 117: 603-608 (1985).
- PICKERING, S.J., FLEMING, T.P., BRAUDE, P.R., BOLTON, V.N. and GRESHAM, G.A.: Are human spermatozoa separated on a Percoll density gradient safe for therapeutic use? *Fertil. Steril.*, 51 (6): 1024-1026 (1989).
- PIEDRAHITA, J.A. and ANDERSON, G.B.: Investigation of sperm cytotoxicity as an indicator of ability of antisera to detect male-specific antigen on preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 74: 637-644 (1985).

- PINKEL, D., GARNES, D.L., GLEDHILL, G.L., LAKE, S., STEPHENSON, D. and JOHNSON, L.A.: Flow cytometric determination of the proportions of X- and Y-chromosome-bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *J. Anim. Sci.*, 60 (5): 1303-1307 (1985).
- PINKEL, D., GLEDHILL, B.L., LAKE, S., STEPHENSON, D., and VAN DILLA, M.A.: Sex preselection in mammals? Separation sperm bearing X and "O" chromosomes in the vole Microtus oregoni Science, 208: 904-906 (1982a).
- PINKEL, D., LAKE, S., GLEDHILL, B.L., VAN DILLA, M.A., STEPHENSON, D. and WATCHMAKER, G.: High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry*, 3(1): 1-9 (1982b).
- PINKEL, D., STRUME, T. and GRAY, J.W.: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 2934-2938 (1986).
- POWELL, R.L., NORMAN, H.D., and DICKINSON, F.N.: Sire differences in sex ratio of progeny. *J. Dairy Sci.*, 58: 293-305 (1975).
- PRATT, N.C., HUCK, U.W. and LISK, R.D.: Offspring sex ratio in hamster correlated with vaginal pH at certain of mating of mating. *Behav. N. Biol.*, 40: 310-316 (1987).
- PRATT, N.C., HUCK, U.W. and LIS, R.D.: Do pregnant hamsters react to stress by producing fewer males? *Anim. Behav.*, 37 (1): 155-156 (1988).
- QUINLIVAN, W.L.G., PRECIADO, K., LONG, T.L. and SULLIVAN, H.: Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and Sephadex chromatography. *Fertil. Steril.*, 37 (1): 104-107 (1982).
- RENARD, J. and BABINET, CH.: Genetic engineering in farm animals: the lessons from the genetic mouse model. *Theriogenology*, 27 (1): 181-200 (1987).
- RHEMREV, J., JEYENDRAN, R.S., VERMEIDEN, J.P.W. and ZANEVELD, L.J.D.: Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertil. Steril.*, 51 (4): 685-690 (1989).
- RIEGER D.: The measurement of metabolic activity as an approach to evaluating viability and diagnosis sex in early embryos. *Theriogenology*, 21 (1): 138-149 (1984).
- ROBERTS, R.M., SCHALUE-FRANCIS, T., FRANCIS, H. AND KEISLER, D.: Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology*, 33 (1): 155-183 (1990).
- ROBL, J.M. and STICE, S.L.: Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology*, 31 (1): 75-84 (1989).
- RONNE, M.: Chromosome preparation and high resolution banding techniques. A review. *J. Dairy Sci.*, 72: 1363-1377 (1989).
- ROWE, R.F.: NONSURGICAL EMBRYO TRANSFER. *Embryo Transfer*, 1 (1): 5-6 (1986).
- RUSSEL, L.D., VOGL, A.W. and WEBER J.E.: Actin localization in male germ cell intercellular bridges in the rat and ground squirrel and disruption of bridges by cytochalasin D. *Am. J. Anat.*, 186: 25-40 (1987).
- SAGAN, C. *Los Dragones del Eden*. Ed. Diana. México 1985.

- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.V., ERLICH, H.A. and ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354 (1985).
- SAIKI, R.K., GELFAN, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. and ERLICH, H.A.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491 (1988).
- SARKAR, S.: Motility, expression of surface antigen, and X and Y human sperm separation in in vitro fertilization medium. *Fertil. Steril.*, 42 (6): 899-905 (1984).
- SCHENK, J.L. and AMANN, R.P.: Effects of exposing bovine sperm to bovine serum albumin, or freeze-thawing, on sperm-bound amidase activity. *Gamete Res.*, 17: 213-219 (1987).
- SCHERER, G., SCHEMPF, W., BACCICHETTI, C., LEXINI, E., BRICARELLI, R.D., LAMBA-CARBONA, L.D. and WOLF, U.: Duplication of an Xp segment that includes ZFX locus causes sex inversion in man. *Hum. Genet.*, 81: 291-294 (1989).
- SEIKE, N., SAEKI, K., UTAKA, K., SAKAI, M., TAKAKURA, R., NAGAO, Y. AND KANAGAWA, H.: Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zona pellucida. *Theriogenology*, 32 (2): 211-220 (1989).
- SHELTON, J.N. and SZELL, A.: Survival of sheep demi-embryo in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 30(5): 855-863 (1988).
- SHETTLES, : Letters to the editor. *Sperm Separation. Fertil. Steril.* 47(3): 534-535 (1987).
- SHNEIDER-GADICKE, A., BEERR-ROMERO, P., BROWN, L.G., NUSSBAUM, R. and PAGE, D.C.: ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*, 57: 1247-1254 (1989).
- SIDHU, N.S.: A brief note on Y chromosome bearing spermatozoal identification in farm animals. *Indian J. Hered.*, XX (3-4): 25-27 (1988).
- SIDHU, N.S., BHUSAN, S. and JOSHI, J.D.: Reproductive engineering through sexing of mammalian spermatozoa by various methods and their separation. *Indian J. Hered.*, XX (3-4): 28-45 (1988).
- SIMMLER, M., ROUYER, F., VERGNAUD, G., NYSTROM-LATHI, M. YEN NGO, K., de la CHAPELLE, A. WEISSENBACH, J.: Pseudoautosomal DNA sequences in the pairing region of the human sex chromosomes. *Nature*, 317: 692-697 (1985).
- SIMPSON, E., CHANDLER, P., GOULMY, E., DISTECHE, C.M., FERGUSON-SMITH, M.A. and PAGE, D.C.: Separation of the genetic loci for the H.Y antigen and for testis determination on human Y chromosome. *Nature*, 326: 876-878 (1987).
- SINCLAIR, A.H., FOSTER, J.W., SPENCER, J.A., PAGE, D.C., PALMER, M., GOODFELLOW, P.N. and MARSHALL GRAVES, J.A.: Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature*, 336: 780-783 (1988).
- SINGH, E.L. and HARE, W.C.D.: The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology*, 14 (6): 421-427 (1980).

- SKRZYŻOWSKA, M. and SMORAG, Z.: Cell loss in dissected mouse, sheep and cow embryos. *Theriogenology*, 32 (1): 115-121 (1989).
- SMITH, L.C. and WILMUT, I.: Factors affecting the viability of nuclear transplanted embryos. *Theriogenology*, 33 (1): 153-164 (1990).
- SOUTHERN, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517 (1975).
- TAKETO, T., MERCHANT-LARIOS, H. and KOIDE, S.S.: Induction of testicular differentiation in the fetal mouse ovary by transplantation into the adult male mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 176: 148-153 (1984).
- TAKETO-HOSOTANI, T., MERCHANT-LARIOS, H., THOAU, R.B. and KOIDE, S.S.: Testicular cell differentiation in fetal mouse ovaries following transplantation into adult males mice. *J. Exptl. Zool.*, 236: 229-237 (1985).
- TAYLOR, J.F., PHILLIPS, K.R. and TOMASZEWSKI, M.A.: Net present value and economic merit of sexed semen and splitting units of semen for Australian Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 71: 3100-3111 (1988).
- TIFFIN, G., TIEGER, D., BETTERIDGE, K.J., YADAV, B.T. and KING W.A.: Measurement of the activity of the pentose phosphate pathway in sexed bovine embryos. *Theriogenology*, 33 (1): 339 Abstr. (1990).
- THOMSEN, J.L. and NIEBUHR, E.: The frequency of false-positive and false-negative results in the detection of Y-chromosome in interphase nuclei. *Hum. Genet.*, 73: 27-30 (1986).
- TOMAR, S.S. and TRIPATHI, V.N.: Inheritance of sex ratio in Murran buttaloes. *ABA*, 58(1): 26, Abstr. 84 (1990).
- TRENT, J.M. and THOMPSON, F.H.: Methods for chromosome banding of human and experimental tumors in vitro. *Methods Enzymol.*, 151: 267-293 (1987).
- TSUNODA, Y., TOKUNAGA, T. and SUGIE. Altered sex ratio of live young after transfer of fast- and slow-developing mouse embryos. *Gamete Res.*, 12: 301-304 (1985).
- UEDA, K. and YANAGIMACHI, R.: Sperm Chromosome Analysis as a new system to test human X- and Y-sperm separation. *Gamete Res.*, 17: 221-228 (1987).
- van VLIET, R.A., VERRINDER GIBBINS, A.M. and WALTON, J.S.: Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. *Theriogenology*, 32 (3): 421-438 (1989).
- VERGNAUD, G., KAPLAN, L., WEISSENBACH, J., DUMÉZ, Y., BERGER, R., TIOLLAIS, P. and GUÉLLAEN, G.: Rapid and early determination of sex using trophoblast biopsy specimens and Y-chromosome specific DNA probes. *Br. Med. J.*, 289: 73-76 (1984).
- VIGIER, F., WATRIN, F., MAGRE, S., TRAN, D. and JOSSO, N.: Purified bovine AMH induces characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development*, 100: 43-35 (1987).
- VILLA, M.M., VARIO, J.J. y ARNAIZ, A.: Sistema HLA y transplante. *Medicine*, 47: 3011-3020 (1988).

- WACHTEL, S.S.: H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*, 21 (1): 18-28 (1984).
- WACHTEL, S.S., KOO, G.C. and BOYSE E.A.: Evolutionary conservation of H-Y (male) antigen. *Nature*, 254: 270-272 (1975a).
- WACHTEL, S.S., OHNO, S., KOO, G.C. AND BOYSE, E.: Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*, 257: 235-236 (1975b).
- WACHTEL, S., NAKAMURE, D., WACHTEL, G., FELTON, W., KENT, M. and JASWANEY, V.: Sex selection with monoclonal H-Y antibody. *Fertil. Steril.*, 50 (2): 355-360 (1988).
- WEBER, J.E. and RUSSELL, L.D.: A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am. J. Anat.*, 180: 1-24 (1987).
- WEIER, H.G., SEGRAVES, R., PINKEL, D. and GRAY, J.W.: Synthesis of Y chromosome-specific labeled DNA probes by in vitro DNA amplification. *J. Histochem. Cytochem.*, 38 (3): 421-426 (1990).
- WERREN, J.H. and CHARNOV, E.L.: Facultative sex ratios and population dynamics. *Nature*, 272: 349-350 (1978).
- WEST, H.D., GOSDEN, J.R., ANGELL, R.R., HASTIE, N.D., THATCHER, S.S., GLASIER, A.F. and BAIRD, D.T.: Sexing the human pre-embryo by DNA-DNA in situ hybridization. *The Lancet* 1: 1345-1347 (1987).
- WEST, J.D., WEST, K.M. and AITKEN, R.J.: Detection of Y-bearing spermatozoa by DNA-DNA in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*, 1: 201-207 (1989).
- WHITE, K.L., ANDERSON, G.B. and BONDURANT, R.H.: Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 37: 867-873 (1987).
- WHITE, K.L., LINDNER, G.M., ANDERSON, G.B. and BONDURANT, R.H.: Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*, 19 (5): 701-705 (1983).
- WHITE, I.G., MENDOZA, G. and MAXWELL, W.M.C.: Preselection of sex of lambs by layering spermatozoa on protein columns. In *Reproduction in Sheep*. Lindsay D. R., Pearce, D.T., Editors. Cambridge University Press. pp. 299-300 (1984).
- WIBERG, U.H.: Facts and considerations about sex-specific antigens. *Hum. Genet.*, 76: 207-219 (1987).
- WILLIAMS, T.J.: A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*, 25 (5): 733-739 (1986).
- WILLIAMS, T.J. and MOORE, L.: Quick-splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, 29 (2): 447-495 (1988).
- WILMUT, I., ARCHIBALD, A.L., HARRIS, S., McCLENNAGHAN, M., SIMONS, J.P., WHITELAW, C.B.A. and CLARK, A.J.: Methods of gene transfer and their potential use to modify milk composition. *Theriogenology*, 333 (1): 113-123 (1990).
- WILSON, J.B.: Sexual differentiation of the gonads and of the reproductive tract. *Biol. Neonate*, 55: 322-330 (1989).

- WILSON, J.D., GRIFFIN, J.E., LESHIN, M. and GEORGE, F.W.: Role of gonadal hormones in development of sexual phenotypes. *Hum. Genet.*, 58: 78-84 (1981).
- WINTENBERGER-TORRES, S. and POPESCU, P.C.: Transfer of cow diastocysts after sexing. *Theriogenology*, 14 (5): 309-318 (1980).
- WOLF, U.: Sex inversion as a model for the study of sex determination in vertebrates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 322: 97-107 (1988).
- WOOD, T.C., WHITE, K.L., THOMPSON Jr. D.L. and GARZA Jr., F.: Evaluation of the expression of a male-specific antigen on cells of equine diastocysts. *J. Reprod. Immunol.*, 14: 1-8 (1988).
- YOSHIZAWA, M., TAKADA, M. and MURAMATSU, T.: Incidence of chromosomal aberrations and primary sex ratio in first-cleavage mouse eggs. *J. Mamm. Ova Res.*, 6 (2): 119-125 (1989a).
- YOSHIZAWA, M., TSUNODA, Y., NOZAWA, E., OKAMOTO, A. and MURAMATSU, T.: Chromosomal sexing of goat embryos after freezing and thawing. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35 (2): 97-100 (1989b).
- YOSHIZAWA, M., NAKAMOTO, S., TSUNODA, Y. and MURAMATSU, T.: A short-term hypotonic treatment for chromosome preparation of intact and zona-penetrated mouse embryos. *Theriogenology*, 33 (4): 789-797 (1990).
- YUNIS, J.J.: High resolution of human chromosomes. *Science*, 191: 1268-1270 (1976).
- ZARCO, L.: Algunos factores que afectan los resultados de la superovulación en el bovino. En: Memorias del Curso Internacional en Biología de la Reproducción, A. C. México, D. F. 113-118. Editado por la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. México, D. F. (1990).
- ZAVOS, P.M.: Preconception sex determination via intra-vaginal administration of H-Y antisera in rabbits. *Theriogenology*, 20 (2): 235-240 (1983).
- ZAVOS, P.M.: Sperm separation attempts via the use of albumin gradients in rabbits. *Theriogenology*, 23 (6): 875-879 (1985).