

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS PARA USO DE
ALBÚMINA SÉRICA BOVINA EN EL SEXADO DE
ESPERMATOZOIDES DE TOROS”**

Presentada por:

GONZALO WLADIMIR GONZALES APARICIO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

Lima - Perú

2016

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	01
II. REVISIÓN DE LITERATURA	03
2.1. GENERALIDADES	03
2.2. SELECCIÓN ESPERMÁTICA COMO MEDIO DE MEJORA GENÉTICA	03
2.3. TECNOLOGÍAS USADAS EN LA SELECCIÓN DEL SEXO DE LA PROGENIE	06
2.4. MÉTODOS PARA SEXAR ESPERMATOZOIDES	06
2.4.1. DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DE ADN	07
2.4.2. DIFERENCIAS DE DENSIDAD CELULAR	08
2.4.3. DIFERENCIAS DE CARGA ELÉCTRICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS ESPERMATOZOIDES	09
2.4.4. DIFERENCIAS EN LA VELOCIDAD DE MIGRACIÓN ESPERMÁTICA.	10
2.5. VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE MUESTRAS SEMINALES SOMETIDAS A PROCESOS DE SEXADO	12
2.5.1. PROPORCIÓN DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS	14
2.5.2. FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA	14
2.5.3. INTEGRIDAD Y REACCIÓN ACROSÓMICA	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	18
3.2. MATERIALES	18

3.2.1	POBLACIÓN Y MUESTRA	18
3.2.2.	MATERIALES DE COLECTA DE DATOS INICIALES	18
3.2.3.	MATERIALES Y MEDIOS USADOS PARA EVALUAR LA CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE LAS MUESTRAS	19
3.2.4.	MATERIALES Y MEDIOS USADOS PARA EVALUAR LA CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE LAS MUESTRAS	19
3.2.5.	MATERIALES Y MEDIOS USADOS PARA EVALUAR LA FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA	20
3.3.	MÉTODOS	20
3.3.1.	VARIABLES CONSIDERADAS EN LA INVESTIGACIÓN	20
	VARIABLES INDEPENDIENTES	20
	VARIABLES DEPENDIENTES	20
3.3.2.	DISEÑO ESTADÍSTICO APLICADO	21
3.3.3.	TIPO DE INVESTIGACIÓN	21
3.3.4.	ELABORACIÓN DEL ESTUDIO Y DETALLE DEL USO DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA CON LOS TRES MÉTODOS PROPUESTOS	22
a.	MÉTODO 1: DOBLE CENTRIFUGACIÓN “M1”	22
b.	MÉTODO 2: CENTRIFUGACIÓN Y MIGRACIÓN “M2”	24
c.	METODO 3. DOBLE MIGRACIÓN “M3”	26
d.	GRUPO CONTROL “M0”	29
3.3.5.	MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS	30
a.	TASA DE RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA	30
b.	TINCIÓN CON QUINACRINA	31
c.	TINCIÓN COMPUESTA AZUL TRIPAN – SOLUCIÓN GIEMSA	32
d.	FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA	34
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1.	TASA DE RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA	35

4.2. CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS EVALUADAS	37
4.2.1. VITALIDAD ESPERMÁTICA	37
4.2.2. MOTILIDAD PROGRESIVA INDIVIDUAL	41
4.2.3. FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA	45
4.2.4. ESPERMATOZOIDES VIVOS CON ACROSOMA NO REACCIONADO	49
4.3. SEPARACIÓN ESPERMÁTICA LOGRADA	53
V. CONCLUSIONES	60
VI. RECOMENDACIONES	61
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
VIII. ANEXOS	71

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Habilidad transmisora promedio de vacas seleccionadas para cría utilizando dosis de semen sexado con diferentes niveles de precisión	05
Cuadro 2.	Resultados de separación de espermatozoides Y obtenidos por diferentes métodos de sexado	12
Cuadro 3.	Características de la muestra espermática sometida al proceso de tinción compuesta con azul tripan – solución Giemsa	33
Cuadro 4.	Número y porcentaje de espermatozoides recuperados con los diferentes métodos propuestos para uso de ASB	35
Cuadro 5.	Vitalidad espermática observada en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB	37
Cuadro 6.	Motilidad progresiva individual observada en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB	42
Cuadro 7.	Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional observado en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB	46
Cuadro 8.	Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB	50
Cuadro 9.	Porcentaje de espermatozoides con cuerpo F en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema para uso de ASB basado en el método propuesto de doble centrifugación “M1”	24
Figura 2. Esquema para uso de ASB basado en el método propuesto de centrifugación y migración “M2”	26
Figura 3. Esquema para uso de ASB basado en el método propuesto de doble migración “M3”	29
Figura 4. Porcentaje de espermatozoides vivos en base a los métodos propuestos para uso de ASB y los momentos de evaluación	39
Figura 5. Fotografía de la coloración parcial de azul tripan – Giemsa para la observación de vitalidad espermática	41
Figura 6. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en base a los métodos propuestos para uso de ASB y los momentos de evaluación	45
Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional en base a los métodos propuestos para uso de ASB y los momentos de evaluación	47
Figura 8. Fotografía de espermatozoides sometidos al test de HOS, para determinar la funcionalidad de membrana plasmática	49
Figura 9. Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado, en base a los métodos propuestos para uso de ASB y los momentos de evaluación	51
Figura 10. Fotografía de espermatozoides coloreados con tinción compuesta azul tripan –Giemsa para observar la reacción acrosómica	53

Figura 11.	Porcentaje de espermatozoides con cuerpo F (cromatina Y) obtenidos con los métodos propuestos para uso de ASB	54
Figura 12.	Fotografías de cuerpos F en espermatozoides tras tinción con diclorhidrato de quinacrina	59

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. MEDIOS Y MATERIALES UTILIZADOS	72
ANEXO 2. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA	74
ANEXO 3. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE VITALIDAD ESPERMATICA	75
ANEXO 4. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA	78
ANEXO 5. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA (REACCIÓN POSITIVA)	81
ANEXO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE INTEGRIDAD DE ACROSOMA	84
ANEXO 7. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE CUERPO F	87
ANEXO 8. FOTOGRAFÍAS PROCESO DE DOBLE CENTRIFUGACIÓN EN ASB	88
ANEXO 9. FOTOGRAFÍAS PROCESO DE DOBLE CENTRIFUGACIÓN EN ASB	89
ANEXO 10. OTRAS FOTOGRAFÍAS	90
ANEXO 11. CUADROS GENERALES DE DATOS Y RESULTADOS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92

DEDICATORIA

*A mi hijo Víctor Leonardo y a
mi esposa Paola Rosa.*

*A mis padres Félix Gonzalo y
Leonor, por toda su confianza.*

*A mis hermanos Grecia, Shirley,
Erick y mis sobrinos.*

*A mis tíos que me dieron todo el
apoyo y cariño siempre.*

*A mis amigos de ayer hoy y
siempre.*

*“La vida a veces nos pone en situaciones muy difíciles y la forma como la afrontamos
define el tipo de persona que somos”*

AGRADECIMIENTOS

Al ing. Prospero Cabrera Villanueva por sus enseñanzas y apoyo como asesor, profesor y amigo en mi formación académica y desarrollo profesional.

Al ing. Enrique Alvarado Malca por su enseñanzas, amistad y su confianza permanente para brindarme todas las oportunidades.

Al todo el personal del Banco Nacional de Semen - UNALM , por el apoyo brindado en la ejecución de la tesis y más que eso en mi desarrollo profesional.

Al Ing. Hernán Cucho de la UNSAAC, por brindarme todas las facilidades y apoyo en la ejecución de esta tesis y de otras investigaciones.

A todos mis profesores de la maestría en Producción Animal , a quienes expreso mi respeto y gratitud por todas sus enseñanzas que son invaluable para mí.

RESUMEN

La investigación se hizo para determinar si era posible hacer variar la proporción de espermatozoides de toros con cromosoma Y mediante el uso de albúmina sérica bovina “ASB” en tres métodos propuestos: Doble centrifugación en ASB (M1); Centrifugación y migración en ASB (M2); Doble migración en ASB, (M3). Las muestras obtenidas, se conservaron durante 20-24 horas a 5°C; luego se congelaron en nitrógeno líquido. La variación en la proporción de espermatozoides con cromosoma Y (cuerpo F) se determinó usando una tinción con diclorhidrato de quinacrina; no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en el porcentaje de cuerpos F, siendo el valor de 48.41%±5.93 para el control; 46.15% ±5.86 para M1; 45.82% ±5.47 para M2 y 47.18% ±4.92 para M3. La tasa de recuperación espermática fue diferente entre los métodos evaluados ($P<0.01$), siendo del 50.69% para M1; 36.23% para M2 y 21.41% para M3. Hubo una reducción significativa ($P<0.01$) de las características espermáticas por efecto del uso de ASB. La vitalidad espermática se redujo del 64.24% en el control a valores de 42.53%, 37.23% y 27.23% para M1, M2 y M3 respectivamente. La motilidad se redujo del 83.11% en el control a 48.11%, 31.89% y 23.11% para M1, M2 y M3 respectivamente. El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional se redujo del 64.62% en el control al 42.74%, 42.58% y 39.63% con M1, M2 y M3 respectivamente; el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado varió del 58.12% en el control a 35.10% con M1; 30.16% con M2 y 20.48% con M3. Se observó una reducción general de las características evaluadas por efecto de la congelación en nitrógeno líquido haciéndolas inviables.

Palabras claves: Albúmina sérica bovina, sexado espermático, diclorhidrato de quinacrina, cuerpo F, acrosoma.

ABSTRACT

This study was conducted to determine if it was possible to vary the proportion of bull sperm with Y chromosome by using bovine serum albumin "BSA" in the following three methods: Double centrifugation in BSA (M1); centrifugation and migration in BSA (M2); Double migration in BSA (M3). The samples obtained, were stored for 20-24 hours at 5°C; then frozen in liquid nitrogen. The variation in the proportion of Y chromosome (f-body) spermatozoa was determined using staining with quinacrine dihydrochloride. No significant difference was observed ($P > 0.05$) in the percentage of (f-body); 48.41 (± 5.93)% for the control; 46.15 (± 5.86)% for (M1); 45.82 (± 5.47)% for (M2) and 47.18 (± 4.92)% for (M3). The spermatozoa retrieval rate differed among the methods evaluated ($P < 0.01$), with 50.69% for (M1), 36.23% for (M2) and 21.41% for (M3). The effect of ASB on sperm characteristics was significant ($P < 0.01$). The sperm vitality was reduced from 64.24% in the control to 42.53% for (M1), 37.23% for (M2) and 27.23% for (M3). Motility was reduced from 83.11% in the control to 48.11%, 31.89% and 23.11% for (M1), (M2) and (M3) respectively. The percentage of sperm with functional membrane was reduced from 64.62% in the control to 42.74%, 42.58% and 39.63% in (M1), (M2) and (M3) respectively. The percentage of live sperm acrosome unreacted was 58.12% in the control; 35.10% in (M1); 30.16% in (M2) and 20.48% in (M3). It is observed that freezing bull sperm in liquid nitrogen reduced the characteristics evaluated making them unviable.

Keywords: bovine serum albumin, sperm sexing, quinacrine dihydrochloride, f-body, acrosome.

I. INTRODUCCIÓN

La posibilidad de poder controlar el sexo de la progenie tuvo siempre especial atención, debido a consideraciones médicas en humanos y económicas en el campo de la producción animal. En humanos esta se da cuando existe el riesgo de transmitir enfermedades genéticas (Zarutskie et al., 1989). En especies de interés zootécnico como en el ganado bovino, la selección del sexo permitiría incrementar la intensidad de selección de un sexo en detrimento del otro (Bekkman et al., 1994 en Costa, 2007).

El sexo genético de un mamífero se determina en el momento de la fertilización, si un óvulo logra ser fertilizado por un espermatozoide portador del cromosoma Y, el resultado es un individuo genéticamente macho; si por el contrario el espermatozoide posee el cromosoma X, el individuo es genéticamente hembra. En ese sentido uno de los métodos para condicionar el sexo de la descendencia puede ser logrado por medio de la separación de los espermatozoides que posean uno u otro cromosoma, ello se denomina sexado de espermatozoides.

Para lograr la separación o sexado espermático existen diversos métodos como son inmunológicos, físicos y bioquímicos, todos estos métodos son utilizados con el propósito de alterar la proporción de espermatozoides que normalmente posee una muestra de semen, siendo la citometría de flujo, la técnica que mejores resultados brinda actualmente; sin embargo no está exenta de problemas, debido sobre todo a la capacidad de fecundación disminuida que muestran los espermatozoides sometidos a este proceso (Cran et al., 1994).

Otros métodos se basan en el uso de medios que forman gradientes o columnas de densidad aplicando en algunos casos, procesos de sedimentación por centrifugación; para ello se usan polímeros sintéticos como el Percoll® (Kaneko et al., 1983), (Mota et al., 2007); ficoll-sodio-metrizoato (Kaneko et al., 1983); en otros casos se utiliza el efecto de la velocidad de migración mediante el uso de medios viscosos como yema de huevo en solución fisiológica (Schilling, 1966), albúmina sérica bovina (Ericson et al., 1973), albúmina sérica humana (Hernández et al., 2008). En cuanto al uso del Percoll®, este fue

descontinuado en humanos debido a que como resultado de su uso, se observó el incremento de problemas de endometritis en mujeres inseminadas con semen centrifugado con dicho medio (Makkar et al., 1999).

El uso de medios de albúmina sérica humana y/o bovina, en columnas o gradientes continuos y discontinuos, son de los métodos más usados para lograr el sexado de espermatozoides en humanos, debido a su ventaja en términos de carencia de toxicidad con respecto al uso del citómetro de flujo ó centrifugación y migración en gradientes de Percoll® y otros medios que contienen silica; sin embargo los resultados en términos de eficacia en la tasa de sexado espermático logrado se muestran muy variables, además las metodologías de trabajo difieren entre las investigaciones revisadas, por ejemplo en humanos mostraron resultados favorables (Ericsson et al., 1973) (Beernink et al., 1993) así como en vacunos (Beal et al., 1984), pero también existen trabajos de investigación cuyos resultados muestran la ineffectividad de dicho producto (Flaherty et al., 1997).

En el Perú no se tiene conocimiento de trabajos experimentales que hayan hecho referencia al sexado de espermatozoides en especies animales, mediante el uso de las metodologías antes mencionadas; sin embargo actualmente, ya se viene comercializando pajillas de semen sexado de ganado bovino, siendo estas únicamente importadas y en el mundo esta tecnología está siendo acogida con gran interés.

La presente investigación tiene por objetivo general determinar si el uso de la albúmina sérica bovina utilizada en diferentes métodos propuestos, puede lograr el hacer variar la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma Y en muestras seminales de ganado bovino, para su uso en inseminación artificial; para ello se plantearon como objetivos específicos: (1) determinar la capacidad de sexado espermático que se puede lograr por el uso de albúmina sérica bovina en tres metodologías propuestas. (2) Evaluar el efecto de dichos procedimientos sobre las características espermáticas consideradas como indicadores usuales de calidad. (3) Evaluar el efecto de la criopreservación sobre las características espermáticas de las muestras resultantes de los procesos para el uso de ASB efectuados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES

Uno de los efectos principales de la aplicación de las tecnologías reproductivas, es el incremento de la eficiencia reproductiva de los animales de interés zootécnico, esto significa que unos pocos reproductores sean capaces de producir una vasta descendencia; ello cobra importancia en el aspecto de la mejora genética debido a que se incrementa la intensidad de selección, el cual es un factor importante para lograr el progreso genético de planteles productivos.

El sexado de semen es una tecnología reproductiva que en aplicación conjunta a la inseminación artificial permite un aumento proporcional en el número de individuos de uno de los dos sexos (masculino o femenino) en la progenie de una población, con ello se permitiría incrementar la intensidad de selección de un sexo, en detrimento del otro (Bekkman *et al.*, 1994 citado por Costa, 2007); aunque también dependerá del tipo de explotación ganadera al que se esté orientado; como ejemplo se tiene que en crianzas de ganado de carne, se busca tener una mayor cantidad de machos debido a los mayores rendimientos productivos de masa muscular; caso contrario sucede en explotaciones orientadas a la producción de leche, en la que la necesidad de tener un macho reproductor en el plantel es nula y por el contrario se desea que la mayor proporción de la progenie sea hembra, porque la producción de leche está ligada al sexo.

2.2. SELECCIÓN ESPERMÁTICA COMO MEDIO DE MEJORA GENÉTICA

La selección espermática es una de las técnicas utilizadas para preseleccionar el sexo de la progenie en un hato, siendo evidente su valor económico significativo en la producción. En el caso del ganado vacuno la productividad de un sistema productivo de leche se verá favorecida por la presencia de una mayor progenie de hembras (Van Vleck *et al.*, 1987). Además la selección del sexo podría evitar algunos problemas ocasionados por transferencia múltiple como el síndrome Freemartin (Palma, 2001).

En la crianza de bovinos lecheros, los programas de mejoramiento genético, tienen por fin incrementar la producción de leche. Para lograr el objetivo es necesario aumentar el mérito genético para las características que son económicamente importantes para dicho carácter, haciéndolo de una forma eficiente y con el menor costo posible (Hossepian de Lima, 2005 en Costa, 2007).

La selección del sexo en hatos lecheros, tienen como objetivos: (1) incrementar la eficiencia reproductiva del rebaño, (2) incrementar la intensidad de selección, (3) disminuir el intervalo generacional y (4) promover el incremento del valor genético de la progenie (Costa, 2007). Por otro lado Van Vleck et al. (1987) demostraron que el valor genético aditivo depende de: (1) la exactitud de la predicción del valor genético aditivo, (2) la intensidad de selección, (3) la desviación estándar de los valores genéticos aditivos y (4) el intervalo generacional.

Un modelo para validar el impacto económico generado por la respuesta a la selección de un hato comercial para producción de leche que utilizaría dosis de semen con mayor proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X (dosis de semen sexado), en vacas de mayor producción y con dosis de semen no sexado para vacas menos productivas, fue desarrollado por Van Vleck & Everett (1976), obteniéndose los resultados de habilidad transmisora para leche que se observan en el Cuadro 1, en el mismo se puede observar que utilizando dosis de semen con una mayor precisión de sexado espermático a favor del cromosoma X, se logró obtener un promedio más alto en la habilidad trasmisora para leche; en dicho modelo los costos contabilizaban el número de inseminaciones necesarias para obtener una cría hembra de calidad genética superior; el costo extra necesario para alimentar a vacas más productivas; los beneficios incluían la producción extra de leche. Con el análisis, se proyectaron los costos a 10 años, resultando en un valor de US\$ 9.67 superior, de dosis con 80% de espermatozoides con cromosoma X, respecto de dosis convencionales.

Además Van Vleck, (1981) desarrolló un estudio en el cual simuló el uso de dosis de semen sexado con espermatozoides poseedores del cromosoma X, y encontró un progreso genético anual del 15% en la producción de leche, cuando son utilizados en hatos destinados a la producción de vaquillas de reemplazo.

Cuadro 1: Habilidad transmisora promedio de vacas seleccionadas para cría utilizando dosis de semen sexado con diferentes niveles de precisión.

Precisión de sexado para spz con cromosoma X	% de vacas requeridas de acuerdo al semen sexado	Crías paridas, en función al semen sexado (*)		Número de vacas para reemplazo	Selección de % superior para reemplazo	H.T.E. leche de las vacas seleccionadas (Kg.)
		X	Y		%	
100	50.00	100	0	45	45.00	161.94
90	55.56	90	10	45	50.00	147.42
80	62.50	80	20	45	56.25	129.28
70	71.43	70	30	45	64.29	108.86
60	83.33	60	40	45	75.00	77.11
50	100.00	50	50	45	90.00	36.34

FUENTE: Modificado de Van Vleck & Everett, (1976)

LEYENDA: Asumiendo plantel de 100 vacas; Exactitud de la habilidad transmisora asumida = 0.65; Desviación estándar de la capacidad de transmisión asumida = 283.5 kg.

Considerando el ejemplo de un sistema de producción de leche en el que se tienen 600 hembras lactantes, sobre las que se utilizan dosis de semen convencional, si se tiene una tasa de gestación de 70%, como resultado se producen 420 terneros de los cuales 50% (210) son hembras y el otro 50% (210) son machos; si de las 210 hembras producidas se seleccionaran 137, en el establo hay una proporción de vaquillas seleccionadas para reemplazo del 65%, ello implica una intensidad de selección de 0.5698 (Cardellino & Rovira, 1986). En caso de utilizarse sobre el mismo plantel, dosis de semen sexado con un 75% de espermatozoides con cromosoma X, teniendo una tasa de gestación igual al caso anterior (70%), se podrían producir 420 terneros, de ellos 315 terneras (75%) son hembras y 105 son machos (25%), al igual que en el caso anterior se seleccionan únicamente a 137 hembras, se logra tener una proporción de novillas seleccionadas para reemplazo de aproximadamente el 33%, la intensidad de selección en este caso será de 1.0985¹, la cual es más alta que en el primer caso. De esta manera se puede apreciar que el uso de dosis de semen sexado permitirá un incremento de la intensidad de selección en un hato y producto de ello se incrementaría el progreso genético de dicho plantel.

Por último se debe tener en cuenta que las tasas de fertilidad y de concepción que se logran con la utilización de dosis de semen sexado, son en algunos casos más bajas que aquellas

¹ Valor hallado en base a una proporción seleccionada del 33% e interpolando la información presente en el cuadro 8.2. p. 127 del libro de Genética y Mejoramiento animal de Cardellino & Rovira (1987).

que se obtienen cuando se utilizan dosis de semen convencional (Cran et al., 1994) (Garner, 2006), sin embargo en otras especies como los búfalos, las tasa de concepción no se ve afectada (Lu et al., 2010).

2.3. TECNOLOGÍAS USADAS EN LA SELECCIÓN DEL SEXO DE LA PROGENIE

Son dos las tecnologías usadas para conseguir la selección del sexo en la progenie, una de ellas es la identificación de sexo genético de los embriones, la otra es la selección espermática de acuerdo al cromosoma sexual que posee la cual se denomina sexado espermático.

Ambas tecnologías reproductivas pueden permitir un aumento en el número de individuos de un determinado sexo en una población; ello tiene su motivación en diferentes objetivos, por ejemplo en el caso de humanos se busca incrementar la frecuencia de la descendencia masculina debido a la posibilidad de evitar la manifestación de enfermedades genéticas ligadas al cromosoma X (Zarutskie et al., 1989).

En especies de interés zootécnico, la selección espermática y de embriones pre-implantados fueron desarrolladas y difundidas debido a que estas tienen un valor económico significativo en la producción; en el caso del ganado vacuno sea de carne o leche se verá favorecida por la progenie de uno de los sexos (Van Vleck et al., 1987); en el caso de la especie bovina la selección del sexo podría evitar algunos problemas ocasionados por la transferencia múltiple en el mismo animal, como es la presencia del síndrome Freemartin (Palma, 2001).

2.4. MÉTODOS PARA SEXAR ESPERMATOZOIDES

El separar las poblaciones de espermatozoides portadores de los cromosomas X e Y se denomina sexado espermático y es posible debido a la existencia de diferencias físicas y químicas entre los dos tipos de células, algunos de ellos son: (1) contenido de ADN, (2) diferencias de densidad celular, (3) diferencias de carga eléctrica de la membrana celular y (4) diferencias de velocidad de migración (Palma, 2001).

2.4.1. DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DE ADN

En la especie bovina se ha observado que existe una diferencia media significativa en el contenido del ADN entre ambos tipos de espermatozoides (X e Y) observándose en la raza Jersey una mayor diferencia (4.24%) frente a otras razas como la Holstein (3.98%) (Palma, 2001). En la década de los ochentas se iniciaron los intentos para establecer la selección del sexo por medio de la cromatina entre los espermatozoides X e Y usando citometría de flujo.

De acuerdo al método adaptado de Cotinot et al., (1993) que fue detallado por Palma (2001); los espermatozoides son marcados con el colorante fluorescente Hoechst 33342. Este colorante se fija al ADN y la fluorescencia emitida por cada cromosoma es proporcional a su tamaño; en ese sentido los espermatozoides que poseen el cromosoma X emiten una señal mayor que aquellos que poseen el cromosoma Y. La fluorescencia emitida por un único espermatozoide es detectada por el citómetro de flujo, la intensidad medida por un detector específico, luego la información es enviada y analizada en un computador y separa los espermatozoides en dos poblaciones. Con esta técnica el eyaculado es diluido en aproximadamente 10×10^6 espermatozoides/mL, se adiciona colorante con afinidad al ADN (Hoechst 33342) a razón de $9 \mu\text{M/mL}$, en seguida las muestras son incubadas durante una hora a una temperatura entre 32 y 35 °C. El colorante unido al ADN pone en evidencia la diferencia en el contenido de ADN entre los espermatozoides que poseen tanto el cromosoma X como el Y, los espermatozoides pasan al citómetro por una única fila a través de un rayo láser que emite un haz de luz ultravioleta de 175 mW (351 - 363 nm .) las emisiones fluorescentes son recibidas en forma simultánea por detectores ópticos que convierten esas señales en un histograma, luego el haz de espermatozoides es interrumpido formando microgotas por medio de ultrasonido, las microgotas que poseen uno o varios espermatozoides (6 a 8% del total de microgotas formadas) a las que se le da una carga eléctrica positiva o negativa de acuerdo a la intensidad de la fluorescencia, la gotas pasan por un campo electrostático y son separadas en dos tubos distintos.

Cran et al., (1994) trabajando con la especie bovina lograron separar espermatozoides X e Y con una precisión del 90% sin embargo, también observaron una menor tasa en la formación de blastocistos la cual fue del 17% frente a 36% del grupo control. Otros

problemas que se observaron con esta metodología son: (1) el elevado costo de la separación que no sobrepasa de 12×10^6 espermatozoides/máquina/hora (Johnson & Welch, 1999) lo cual restringe su uso en inseminación artificial, (2) el bajo número de espermatozoides sexados viables, (3) la larga exposición al colorante Hoechst 33342 a 35°C , (4) la necesidad de usar semen fresco ya que ocurre una disminución de la eficiencia del sexado cuando se utilizan muestras criopreservadas debido a la falta de coloración uniforme que se observa en los núcleos de espermatozoides que han sido previamente congelados (Johnson et al., 1994).

El colorante Hoechst 33342 utilizado en concentraciones de $90 \mu\text{M}$ afectan la motilidad espermática y concentraciones de aproximadamente $900 \mu\text{M}$ produce mutaciones en el ADN de los espermatozoides (Watkins et al., 1996), razón por la cual esta técnica no es utilizada para efectuar el sexado de espermatozoides humanos.

2.4.2. DIFERENCIAS DE DENSIDAD CELULAR

El uso del diferencial de densidad que tiene cada tipo de espermatozoide, se basa en el contenido de ADN y proteína nuclear en la cabeza de los espermatozoides. La diferencia que se observa en el contenido de ADN entre los espermatozoides X e Y bovinos es de $7 \times 10^{-4} \text{ gr/cm}^3$, es decir un 0.06% entre espermatozoides X e Y. Esa característica fue aprovechada en trabajos de centrifugación mediante el uso de medios como el ficoll-sodio-metrisoato, Percoll® y Optipret® entre otros; con estos preparados se obtuvieron medios de densidad variable, formando gradientes continuos en las que se dio un aumento gradual de la densidad desde la parte superior a la inferior, o discontinuos, en los que se utilizan dos cámaras o recipientes diferentes.

Con los medios densos y la aplicación de fuerza gravitacional por centrifugación es posible provocar un desplazamiento diferencial entre los dos grupos de espermatozoides sean portadores del cromosoma X o Y. Es así que debido a la mayor densidad de los espermatozoides portadores de cromosoma X respecto de los espermatozoides portadores del cromosoma Y, se pueden sedimentar de forma diferencial.

Mediante el uso de Percoll® y fuerza centrífuga, Kaneko *et al.*, (1983) obtuvieron diferencias significativas de 73% y 27% de espermatozoides humanos Y, en las fracciones superior e inferior de gradientes continuas.

Aunque el uso del Percoll® resultó ser satisfactorio como medio con capacidad de sexado de espermatozoides para procedimientos de inseminación artificial y fertilización *in vitro*, dejaron de utilizarse con muestras seminales humanas, debido a la aparición de casos endometritis en las mujeres inseminadas con semen sexado por medios coloidales que poseen sílica como es el caso del Percoll® (Makkar *et al.*, 1999).

En la especie bovina, Palma (2001) hizo referencia al trabajo de Schwiderski *et al.*, (1991) quienes obtuvieron una exactitud de 74.8% de espermatozoides poseedores del cromosoma X, después de efectuar el proceso de separación espermática; para ello se utilizó un gradiente de 10 fases con densidades que variaron entre 1.034 gr/cm³ y 1.068 gr/cm³, sobre las cuales se colocó una muestra de semen y se sometió a centrifugación a razón de 500G durante 10 minutos. En otra investigación efectuada por Hossepian de Lima (1998) mostró como resultado una precisión de separación del 75% tanto en bovinos europeos e índicos.

Un factor a tener en cuenta es la tasa de recuperación espermática del total de espermatozoides procesados con las gradientes de Percoll®; esta tiene una media de 4.65% para muestras previamente criopreservadas y de 12% para muestras frescas (Costa, 2007).

2.4.3. DIFERENCIAS DE CARGA ELÉCTRICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS ESPERMATOZOIDEOS

Consiste principalmente en la diferencia que existe en la concentración de ácido siálico en la membrana plasmática de espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y (Kaneko *et al.*, 1984).

Ishijima *et al.*, (1991), midieron los potenciales zeta de los espermatozoides con cromosomas X e Y por medio de espectrofotometría y separaron las dos fracciones por medio de electroforesis, la validación de la separación se hizo mediante la técnica de tinción con colorante quinacrina mostaza. El potencial Z de la fracción que contenía más del 80% de espermatozoides con cromosoma Y, fue de -16 milivoltios (mV) y el de la

fracción que contenía más de 95% de espermatozoides con cromosoma X, poseía una carga eléctrica de -20 mV, con ello se comprobó que los espermatozoides portadores del cromosoma X, tienen una carga eléctrica más alta y por ello tienen una mayor movilidad electroforética (Palma, 2001).

Por su parte Blottner et al., (1994) trabajando con muestras de bovinos lograron separar dos fracciones de espermatozoides con cromosoma Y, una de ellas con el 61% y la otra con 28% correspondientes a la región aniónica y catiónica respectivamente; en este caso la cuantificación se hizo mediante la técnica de hibridación *in situ* "ISH", utilizando secuencias específicas del cromosoma Y.

2.4.4. DIFERENCIAS EN LA VELOCIDAD DE MIGRACIÓN ESPERMÁTICA

Se basa en la diferencia del tamaño y volumen que existen entre los dos tipos de espermatozoides y basa su principio en el movimiento propio de las células a través de un medio que ofrece resistencia al avance, por lo tanto únicamente las células motiles y sin anomalías pueden migrar formando fracciones ricas en espermatozoides portadores de cromosomas X o Y; en medios densos las células espermáticas portadoras del cromosoma Y, teóricamente pueden avanzar más rápidamente hacia el fondo del recipiente ya que son más pequeñas que las portadoras del cromosoma X, además al ser más pequeñas tienen menor superficie de fricción (Palma, 2001); también se aprecia una diferencia en la motilidad progresiva presentada por los dos tipos celulares al ser cultivadas en medio o gradiente que contiene albúmina sérica bovina "ASB" (Ericsson et al., 1973).

Schilling (1966), realizó un experimento con semen de toros, con el cual pudo separar espermatozoides por la variación existente en su velocidad de migración en un medio viscoso compuesto por yema de huevo y solución salina en gradientes continuas de diferente densidad; con los espermatozoides localizados en la parte inferior de dicha gradiente se efectuaron inseminaciones obteniéndose una tasa del 70% de hembras, como promedio en un periodo de los tres años en que se usaron dichas muestras.

En el caso de humanos Ericsson et al., (1973) utilizando ASB en un proceso de sedimentación por medio de gradientes discontinuas, consiguió aislar una fracción de aproximadamente el 85% de espermatozoides portadores del cromosoma Y; estos

resultados son discutidos debido a que en experimentos replicados, no encontraron desvíos significativos a favor de espermatozoides portadores de uno u otro cromosoma (Flaherty *et al.*, 1997).

Böttcher (1996), trabajando con espermatozoides humanos, comparó un método de centrifugación en gradiente de densidad en base a Percoll® con la técnica de migración espermática o *swim up*, asociada a sedimentación en gradiente de albúmina sérica humana “ASH”, obteniéndose una tasa de separación del 74% de espermatozoides con cromatina Y denominándolo cuerpo F (cuerpo fluorescente) en la fracción superior de la gradiente y 62% de espermatozoides portadores del cromosoma X en la fracción inferior; en este caso la determinación de la presencia de cromatina Y se efectuó mediante la tinción con quinacrina y fue observado con microscopio de fluorescencia.

Hernández *et al.*, (2008) efectuaron un experimento para separar espermatozoides de conejos portadores de cromosomas Y, mediante simple migración en gradientes continuas de ASH sin centrifugación; con los espermatozoides obtenidos en la fracción inferior se efectuaron inseminaciones, obteniéndose un 73% de gazapos machos y 23% de gazapos hembras.

En el caso de muestras seminales humanas, Chen *et al.*, (1997) realizando experimentos de migración lograron encontrar diferencias estadísticas significativas en la variación de la proporción de espermatozoides con cromosoma X, como producto de la migración en ese medio. Un año después Rose & Wong (1998) pudieron obtener una variación pequeña en la proporción de espermatozoides con uno y otro cromosoma haciendo uso de gradientes de densidad preparado con ASH.

Flaherty *et al.*, (1997) como producto de su investigación, concluyeron que el método de migración y centrifugación en gradientes de albúmina era inefectivo en el propósito de alterar la proporción de espermatozoides portadores uno u otro cromosoma sexual.

Björnahl & Barratt, (2003) hicieron referencia a que el uso de ASB, interactuó con el colorante quinacrina mostaza, ocasionando la presencia de una mayor frecuencia de cuerpos brillantes que se confundieron con espermatozoides portadores del cromosoma Y; los mismos autores concluyeron que el uso de gradientes de albúminas en los protocolos de

migración y/o centrifugación no enriquecía ningún grupo celular, sino que su efecto se daba en el incremento funcional de un grupo de células espermáticas frente al otro, lo que podía hacer variar la proporción del sexo en la progenie.

Además del uso de gradientes de albúminas, es posible utilizar gradientes de densidad preparadas con compuestos como el Percoll® (Böttcher, 1996), el Optipret® (Resende et al., 2009) o el Bovipure® (Samardzija et al., 2006), como se observa en el Cuadro 2, en el que además se pueden apreciar los resultados de investigaciones realizadas para sexar espermatozoides mediante diversos métodos de migración.

Cuadro 2: Resultados de separación de espermatozoides Y obtenidos por diferentes métodos de sexado

Método usado	Prueba de evaluación	% esp. Y inicial	% esp. Y resultante	Autor, (año)
Gradiente albúmina	Cuerpo F	49	84	Ericsson et al., (1973)
	Cuerpo F	43	46	Goodall & Roberts, (1976)
	Cuerpo F	41	67	David et al., (1977)
	Cuerpo F	45	70	Dmowski et al., (1979)
	Citogenético	50	43	Brandriff et al., (1986b)
	FISH	48	47	Wang et al., (1994)
Gradiente Percoll	Cuerpo F	47	28	Iizuka et al., (1987)
	Shouthern Blot	50	50	Vankooij & Van Oost, (1992)
	Cuerpo F	45	50	Engelmann et al., (1989)
Migración “Swim up”	Cuerpo F	45	50	
Migración “Swim up”	PCR	50	52	Lobel et al., (1993)
	PCR y FISH	47	47	Han et al., (1993)
	Gradiente Sephadex	Cuerpo F	30	33
Citogenético		46	45	
Shouthern Blot		45	37	

FUENTE: Adaptado de Böttcher (1996)

LEYENDA: *FISH*: Hibridación *in situ* con fluorescencia. *PCR*: Reacción en cadena de polimerasa, *Cuerpo F*: cuerpo Fluorescente refiriéndose al cromosoma Y.

2.5. VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE MUESTRAS SEMINALES SOMETIDAS A PROCESOS DE SEXADO

La evaluación de la viabilidad espermática es importante sobre todo cuando se trabaja con muestras seminales que van ser sometidas a procesos de manipulación, tales como la capacitación espermática *in vitro*, procedimientos de sexado espermático y procedimientos de criopreservación en pajillas, ya que todos ellos ocasionan efectos negativos o de estrés

en la estructura celular, como ejemplo, los procedimientos de capacitación buscan alterar la composición de la membrana plasmática para permitir el ingreso de iones de calcio y ocasionar cambios de pH interno además del incremento del metabolismo celular (Palma, 2008). Otro ejemplo se ve en el caso de muestras manipuladas con citómetro de flujo, utilizando colorantes fluorescentes como el Hoescht 33342, que ocasionan alteraciones en el ADN celular (Watkins et al., 1996) y daño acrosomal (Libbus et al., 1987); sin embargo actualmente las mejoras en los procedimientos del uso del citómetro de flujo y una reducción en la presión de separación, han permitido una reducción en el daño celular (Palma, 2008).

Para realizar el análisis seminal se toman en cuenta diversas características; en el caso de la evaluación macroscópica se evalúan, la licuefacción, viscosidad del semen, color-aspecto del semen, volumen seminal y pH; en la evaluación microscópica se consideran: la concentración espermática, motilidad espermática, vitalidad espermática, defectos morfológicos espermáticos, entre otros (Organización Mundial de la Salud “OMS”, 1992); otras características espermáticas menos evaluadas son: la reacción al estrés oxidativo (Córdova et al., 2009); la evaluación de desnaturalización o fragmentación de ADN (Evenson et al., 2002) (Zubkova & Robaire, 2006); reacción acrosómica (Talbot & Chacón, 1981) (Kovács & Foote, 1992) (Böttcher, 1996) (Kútvolgyi et al., 2006). Respecto a la viabilidad espermática o capacidad fecundante, se toma la motilidad espermática progresiva como la principal característica al momento de efectuar dicho análisis (Squires et al., 2004) sin embargo ésta se emplea erróneamente para determinarla, porque esta es el resultado de procesos complejos (Watson, 2000) y depende de otras características además de la propia motilidad del espermatozoide, entre los que se puede mencionar: (1) presencia de acrosoma intacto, (2) integridad de ADN espermático, (3) integridad de la membrana plasmática, por citar algunas de estas.

Las características generales que son tomadas en cuenta para efectuar la evaluación de la viabilidad y calidad espermática en esta investigación son: (1) vitalidad o proporción de espermatozoides vivos y muertos (2) motilidad progresiva individual (3) funcionalidad de membrana plasmática (4) integridad acrosómica; la razón por la cual fueron considerados se detallan a continuación.

2.5.1. PROPORCIÓN DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS

Se refiere a cantidad de espermatozoides que están vivos o tienen la membrana plasmática funcional respecto al total de espermatozoides de una muestra seminal, su evaluación forma parte de los exámenes que comúnmente se efectúan para determinar la calidad de la muestra seminal.

La forma de discernir la cantidad de espermatozoides vivos respecto de los muertos se hace con la tinción de eosina - nigrosina (OMS, 1992), con esta prueba los espermatozoides vivos que poseen la membrana plasmática funcional son capaces de repeler al colorante eosina por ello cuando se efectúa la observación al microscopio, se puede observar la cabeza de color blanco; por el contrario, los espermatozoides que están muertos no muestran actividad de la membrana plasmática por lo tanto el colorante eosina la atraviesa y se incorpora en la cabeza de los espermatozoides mostrándose al microscopio de color rosado.

Las células espermáticas que son sometidas a diferentes procesos de manipulación sufren diversos grados de deterioro en su estructura celular, por lo que esta prueba puede ser utilizada en primera instancia para evaluar el nivel de daño en la muestra seminal que ha sido procesada.

2.5.2. FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA

La funcionalidad de la membrana plasmática ha sido utilizada para valorar la viabilidad y calidad seminal, por ser responsable de hacer efectiva la interacción celular y participar en su metabolismo; sin embargo no solo es importante para efectuar el metabolismo espermático, sino que un correcto cambio en las propiedades físicas de las membranas celulares es necesario para que se de la unión entre el espermatozoide y el ovocito (Jeyendran et al., 1984) por lo tanto es requerida en el proceso de fertilización del ovocito. Además de permitir conocer la capacidad vital de los espermatozoides, Correa & Zavos (1994) encontraron una correlación de 0.72, entre el porcentaje de espermatozoides motiles, con aquellos que reaccionaban al test de HOS; Jeyendran et al., (1984) encontraron una correlación R de 0.90, entre el porcentaje de reacción al test de HOS y el

porcentaje de penetración al ovocito y de una correlación R de 0.61 con el porcentaje de MPI.

Se han desarrollado diversos ensayos a fin de determinar la funcionalidad del mismo (Jeyendran et al., 1984) (Rubio-Guillén, 2007), basados en la propiedad de la membrana celular de permitir el transporte selectivo de moléculas entre el líquido intracelular y líquido extracelular; en ese sentido cuando una célula es sometida a condiciones de medio hipo-osmótico el agua ingresa al interior de esta con el fin de lograr el equilibrio entre el medio interno y externo, lo que se denomina equilibrio osmótico. Los espermatozoides que han sido sometidos a un medio hipo-osmótico presentan un cambio en la morfología celular expresada en un hinchamiento del flagelo celular (Drevius & Eriksson, 1966); este principio se utiliza para determinar la funcionalidad de la membrana celular, ya que una membrana funcional es aquella que permite compensar el equilibrio osmótico entre los medios intra y extra celular.

Diversos autores han desarrollado pruebas para determinar la funcionalidad correcta de la membrana plasmática, basados en el uso de diversos medios hipo-osmóticos, ello comúnmente ha sido denominado como: *test de endosmosis*, *test hipo-osmótico* o *HOS test*, por sus siglas en inglés.

Jeyendran et al., (1984) hicieron uso de una solución formada por dos partes iguales de citrato de sodio y fructosa con 150 mOsm, para determinar la funcionalidad de la membrana celular; Revell & Mrode, (1994) hicieron uso del mismo medio, cultivando las muestras espermáticas por un periodo de 40 a 60 minutos, a una temperatura de 35°C. Respecto al valor de osmoles del medio utilizado, Correa & Zavos (1994) determinaron que soluciones de menos de 100 mOsm, permitían la observación de un máximo número de espermatozoides claramente hinchados; en esta misma investigación se determinó una correlación alta entre los espermatozoides con la membrana intacta y la reacción hipo-osmótica (R =0.81).

2.5.3. INTEGRIDAD Y REACCIÓN ACROSÓMICA

La valoración de la integridad de la membrana acrosómica en los espermatozoides permite saber la proporción de células que poseen la capacidad para penetrar la zona pelúcida y

fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Kopf & Gerton, 1991), por ello es considerado como un parámetro importante en la evaluación seminal, ya que tiene una correlación alta con la capacidad fertilizante in vivo (Aisen et al., 2002), en algunos casos se le denomina viabilidad espermática, pero es mejor considerarlo como un componente importante de esta última.

La reacción acrosómica es el requisito absoluto dentro del proceso de la fecundación, haciendo al espermatozoide, capaz de penetrar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Kopf & Gerton, 1991); esto solo ocurre cuando los espermatozoides están capacitados y han tomado contacto con la zona pelúcida (Palma, 2001).

Bajo condiciones naturales un agonista derivado del complejo Cúmulus-ovocito denominado, glicoproteína de la zona pelúcida ZP3 es capaz de ocasionar la exocitosis acrosomal (Bleil & Wassarman, 1983); además de ese compuesto se considera que la progesterona tiene también la misma capacidad (Palomo, 1995).

El proceso de reacción acrosómica implica la fusión de las membranas acrosomal externa y la membrana plasmática que la recubre, con ello se permite exocitosis acrosomal o liberación de enzimas hidrolíticas formando así vesículas membranales híbridas las cuales son expuestas a la zona pelúcida, pudiendo así penetrarla y posibilitar la fecundación (Crozet & Dumont, 1984).

Debido a que el acrosoma posee diversas enzimas hidrolíticas el espermatozoide puede ser autodigerido en algunos casos; esta reacción acrosómica espontánea puede ocurrir por factores como los tratamientos a los que son sometidos los espermatozoides, la composición del medio, como la adición de Ca^{2+} (Fraser & McDermott, 1992) y características del plasma seminal (Parks et al., 1987). Si el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosómica prematura, aun estando vivo después de ser sometido al proceso de criopreservación, esta célula pierde su capacidad para poder fecundar el ovocito (Córdova, 2009).

Son diversas las técnicas que se han desarrollado con el objetivo de valorar la situación del acrosoma y la pérdida del mismo, una de ellas es la técnica de triple tinción desarrollada

por Talbot & Chacón (1981), que basa su metodología en la tinción de los espermatozoides haciendo uso de los colorantes, rosa de bengala, azul tripán y pardo Bismark; otra metodología fue planteada por Kovács & Foote (1992) utilizando colorante azul tripán y solución Giemsa; en el trabajo realizado por Kútvölgyi et al., (2006) plantearon un protocolo para evaluar el acrosoma mediante el uso del colorante azul cielo y solución Giemsa; finalmente también se encontró un protocolo que hace referencia al uso del colorante fluorescente yoduro propidio en asociación con leptina *Pisum Sativum* PSA (Nolan et al., 1992). Todos ellos permiten diferenciar espermatozoides con acrosoma intacto y aquellos con acrosoma reaccionado.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de la Molina, provincia y región de Lima, donde se efectuó la colección de las muestras de semen, el procedimiento de sexado y la evaluación de las características microscópicas de las muestras recuperadas. Otra parte de la investigación se efectuó en los laboratorios de reproducción animal de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicados en el centro experimental de la Raya - distrito de Maranganí, provincia de Canchis, región Cusco, donde se evaluó la presencia de la cromatina Y en las muestras espermáticas obtenidas.

3.2. MATERIALES

3.2.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población considerada para la investigación, fueron los toros reproductores jóvenes del Servicio de Reproducción Animal – Banco Nacional de Semen de la UNALM, los cuales estuvieron sometidos a las mismas condiciones de manejo, alimentación y ambiente; de ellos se tomó como muestra a tres toros, uno de raza Brown Swiss, un Holstein y un Simmental, de ellos se extrajeron tres eyaculados fraccionados para los métodos de sexado y sus respectivos controles.

3.2.2. MATERIALES DE COLECTA DE DATOS INICIALES

- a. Libreta de registro.
- b. Microscopio de contraste de fases.
- c. Fotómetro Accucell® y cubetas descartables para fotómetro.
- d. Cuatro cámaras de Neubauer.

- e. Tubos cónicos para centrífuga de 14 mL.
- f. Portaobjetos y cubreobjetos.
- g. Micropipeta de 10 a 100 μL y puntas descartables.
- h. Micropipeta de 100 a 1,000 μL y puntas descartables.
- i. Solución salina fisiológica “SSF”.
- j. Dilutor comercial de semen bovino Andromed®.
- k. Medio de mantenimiento “MM” (ANEXO 1)

3.2.3. MATERIALES Y MEDIOS USADOS PARA EL PROCESO DE SEXADO ESPERMÁTICO

- a. Centrífuga con rotor fijo a 45°.
- b. Microscopio de Fluorescencia para la observación del cuerpo F.
- c. Solución madre de ASB. (ANEXO 1)
- d. Colorante fluorescente diclorhidrato de quinacrina.
- e. Medio Tampón McIlvaine's. (ANEXO 1)
- f. Fijador Carnoy (ANEXO 1).
- g. Solución fisiológica salina.
- h. Micropipeta de 100 a 1,000 μL y puntas descartables.
- i. Portaobjetos y cubreobjetos.
- j. Dilutor comercial de semen Andromed®.
- k. Tubos cónicos de ensayo plásticos rotulados de 14 mL.

3.2.4. MATERIALES Y MEDIOS USADOS PARA EVALUAR LAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE LAS MUESTRAS

- a. Centrífuga con rotor fijo a 45°.
- b. Microscopio de contraste de fases.
- c. Incubadora y baño maría.
- d. Colorantes: Azul tripan, solución Giemsa.
- e. Fijador metanol al 100%.
- f. Solución salina fisiológica.
- g. Portaobjetos y cubreobjetos.
- h. Tubos de ensayo para centrifugado de 2 cm^3 con tapa rosca.

- i. Micropipeta de 10 a 100 μ L y puntas descartables.

3.2.5. MATERIALES Y MEDIOS USADOS PARA EVALUAR LA FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA

- a. Microscopio de contraste de fases.
- b. Centrífuga con rotor fijo a 45°.
- c. Medio de mantenimiento “MM”.
- d. Solución hipo-osmótica (ANEXO 1).
- e. Baño maría.
- f. Tubos de ensayo rotulados de 2 mL con tapa rosca.
- g. Colorante de contraste simple
- h. Portaobjetos y cubreobjetos
- i. Micropipeta de 10 a 100 μ L y puntas descartables.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. VARIABLES CONSIDERADAS EN LA INVESTIGACIÓN

- VARIABLES INDEPENDIENTES

- a. Métodos para uso de ASB propuestos (doble centrifugación, centrifugación y migración, doble migración).
- b. Toros (tres toros reproductores).

Los métodos para el uso de ASB propuestos, se detallan en el ítem 3.3.4.

- VARIABLES DEPENDIENTES

- a. Eficacia de sexado o porcentaje de cuerpo F en la muestra (%).
- b. Tasa de recuperación espermática (millones de spz/mL y %).
- c. Vitalidad espermática (%)
- d. Motilidad progresiva individual (%).
- e. Espermatozoides con membrana plasmática funcional (%).
- f. Reacción acrosómica (%)

Las técnicas utilizadas para la obtención de los datos de cada una de las variables independientes se detallan en el ítem 3.3.5.

3.3.2. DISEÑO ESTADÍSTICO APLICADO

Para el experimento se consideró el uso de albumina sérica bovina en tres métodos propuestos, se utilizaron las muestras seminales de tres toros; a cada uno de ellos se le extrajo cinco eyaculados; para efectuar el análisis estadístico de las variables consideradas, se propuso un diseño estadístico de bloques completamente al azar con sub-muestreo. El modelo lineal del diseño utilizado es el siguiente:

$$Y_{ijk\ell} = \mu + M_i + B_j + (M \times B)_{ijk} + e_{ijk\ell}$$

Dónde:

$Y_{ijk\ell}$ = Variable dependiente o respuesta

μ = Media

M_i = Método de sexado (M1; M2; M3; M0)

B_j = Toro (toro 1; toro 2; toro 3)

$(M \times B)_{ijk}$ = Error de observación

$e_{ijk\ell}$ = Error experimental

Los valores hallados se expresaron en porcentaje, por ello se transformaron con la función arcoseno, para luego ser evaluados mediante el análisis de varianza, los datos se ordenaron de acuerdo a un diseño estadístico mencionado anteriormente. La comparación de medias se hizo mediante la prueba de Duncan.

3.3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación que se realizó fue experimental por que se buscó modificar las variables de estudio usando ASB mediante tres métodos propuestos. En cuanto al tiempo de ejecución fue de tipo transeccional (Salkind, 1998) (Hernandez, 2010).

3.3.4. ELABORACIÓN DEL ESTUDIO Y DETALLE DEL USO DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA CON LOS TRES METODOS PROPUESTOS

Para efectuar el estudio se utilizaron cinco muestras de semen que fueron colectadas, de tres toros de diferentes razas, dichas muestras de semen fueron sometidas a una evaluación inicial de sus características macroscópicas referidas al volumen, color y aspecto. En cuanto a la evaluación de sus características microscópicas se estimó la concentración espermática mediante el uso de un fotómetro Acucell®; con esta información se pudo determinar el volumen del medio de mantenimiento requerido para diluir las muestras seminales a una concentración final de 400×10^6 espermatozoides /mL, denominándose esta, como suspensión espermática; con la cual se procedió a efectuar el experimento, diseñado para la investigación.

El estudio consistió en el uso de un medio elaborado con albumina sérica bovina “ASB” en tres diferentes métodos propuestos, para caso se tomó un volumen de 0.5 mL de suspensión espermática haciendo un total de 2.0 mL de suspensión espermática. Se requirió en total quince eyaculados, cinco de cada toro. Los métodos propuestos se detallan a continuación.

a. MÉTODO 1: DOBLE CENTRIFUGACIÓN “M1”

En este caso el método propuesto para el uso de ASB aprovecha el principio de las diferencias de densidad existentes entre los dos tipos de espermatozoides portadores tanto de cromosomas X como Y. Los espermatozoides que portan el cromosoma X tienen mayor densidad que los espermatozoides portadores del cromosoma Y, por lo tanto al colocar una muestra espermática diluida, sobre un medio viscoso o de mayor densidad del que contiene las células y al ser sometida esta, a procesos de centrifugación se puede ocasionar un desplazamiento diferencial de los dos tipos de espermatozoides a lo largo de la columna de ASB; ello haría que exista una mayor proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X, ubicados en la fracción más distal de las columnas de ASB.

Para efectuar este procedimiento con ASB, se realizó una primera centrifugación utilizando una columna de solución madre de ASB al 50.0% luego de lo cual se recuperó la fracción inferior, para volver a someterla a una segunda centrifugación, en este caso se

efectuó en una columna de medio elaborado con solución madre de ASB al 100.0%; para ejecutar cada repetición el experimento se utilizó aproximadamente 200×10^6 espermatozoides contenidos en un volumen de 0.5 mL de suspensión espermática de la misma muestra seminal que fue usada para los otros métodos propuestos.

El procedimiento detallado se hizo, colocando la suspensión espermática de forma cuidadosa en un tubo de ensayo plástico con tapa rosca de 14 mL, al que previamente le fue añadido 4 mL de medio preparado a partir del 50.0% solución madre de ASB y 50.0% de medio de mantenimiento, temperado entre 20-22°C durante 10 minutos, luego de lo cual se le añadió la suspensión espermática la cual se encontraba a igual temperatura. Una vez que se comprobó que la suspensión espermática se encontraba claramente posicionada encima del medio de ASB, esta se colocó en una centrifuga con rotor fijo a 45° y se centrifugó durante diez minutos a 1,000 RPM; luego de ello se retiró el medio sobrenadante con la ayuda de una micropipeta graduable de 100 a 1,000 μ L; haciéndolo de forma cuidadosa hasta dejar un volumen de 1.5 mL de medio correspondiente a la parte inferior que incluía a la pastilla de esperma, esta fue disuelta en el medio que se dejó en el tubo de ensayo para ser recuperada.

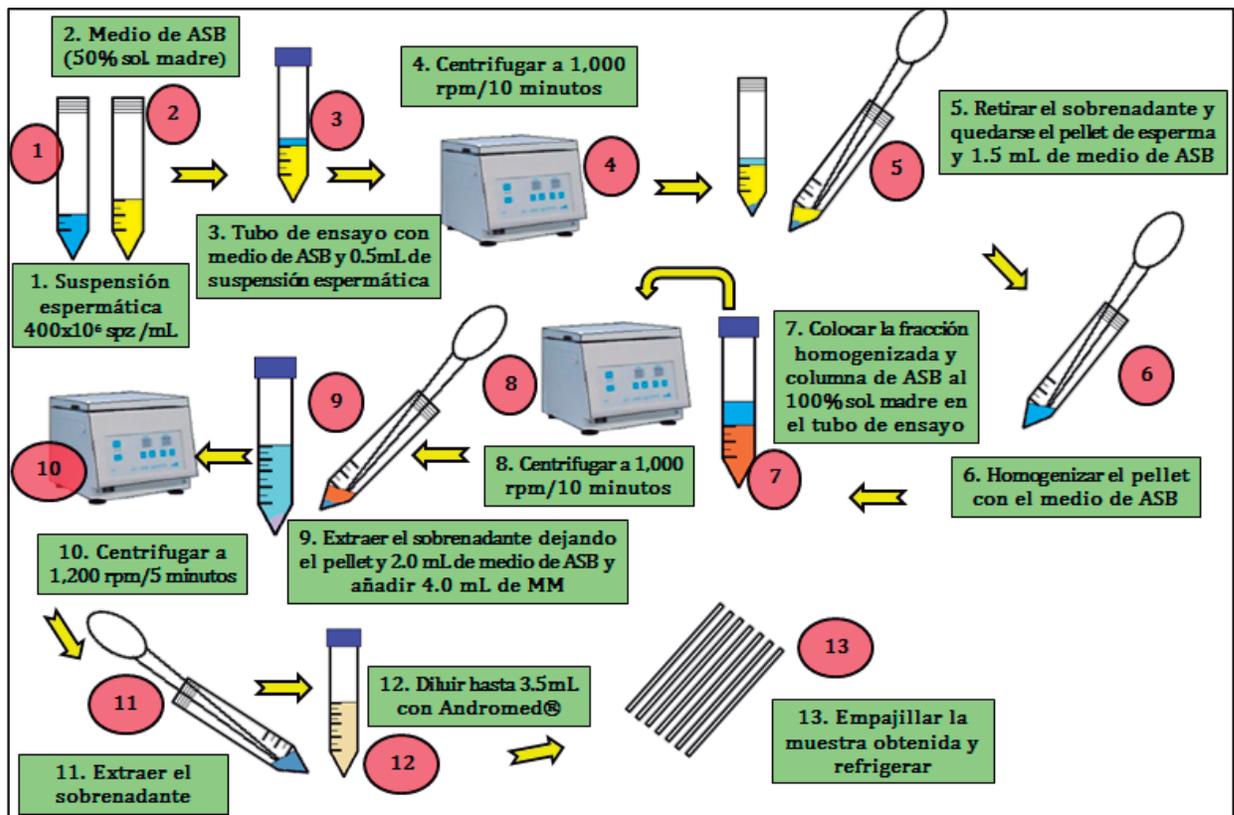
La fracción fue recuperada se colocó en otro tubo de ensayo al que previamente se le añadió 4.0 mL de solución madre de ASB al 100.0%, de manera que esta fracción se mantuviese en la parte superior de la nueva columna de ASB, luego de ello, se centrifugó a razón de 1,000 RPM durante 10 minutos, una vez concluido esta segunda centrifugación, se retiró el sobrenadante haciéndolo de forma cuidadosa, utilizando para ello una micropipeta graduable de 100 a 1,000 μ L dejando 2.0 mL de medio de ASB de la parte inferior incluyendo la pastilla de espermatozoides que se hubiera formado, a esta fracción se le añadió un volumen de 4.0 mL de medio de mantenimiento y luego de ello se centrifugó a 1,200 RPM durante 5 minutos, para poder retirar el exceso el medio de ASB, quedándose únicamente con un volumen de 0.5 mL que contenía el pellet de esperma; por ultimo esta fracción se le añadió dilutor Andromed® hasta llegar a un volumen final de 3.5 mL, homogenizando la muestra y envasándola en pajillas de 0.5 mL.

Las muestras obtenidas fueron conservadas en refrigeración durante 20-24 horas y luego de ello se procedieron a congelar en nitrógeno líquido, siguiendo el protocolo desarrollado por el Banco Nacional de Semen – UNALM.

La evaluación de las muestras recuperadas se realizó en tres momentos diferentes, (1) dos horas después de haber empajillado las muestras; (2) 20-22 horas después de refrigerarlas y (3) 24 horas después de haberlas congelado en nitrógeno líquido.

El procedimiento descrito se muestra de forma gráfica en el siguiente esquema:

Figura 1. Esquema para uso de ASB basado en el método propuesto de doble centrifugación “M1”



b. MÉTODO 2: CENTRIFUGACIÓN Y MIGRACIÓN “M2”

El segundo método para el uso de ASB considera en una primera etapa, el principio de diferencias de densidad de los dos tipos de espermatozoides, y en una segunda etapa usa la velocidad de migración y la diferencia de tamaño existente entre ambos tipos de espermatozoides. El primer proceso de centrifugación se hace en solución madre ASB al 50.0% y busca obtener una fracción de suspensión espermática que contenga una mayor proporción de espermatozoides portadores de cromosoma X, los cuales teóricamente estarían situados en la parte distal del medio de ASB y en el pellet formado en el fondo del

tubo de ensayo. La fracción distal y el pellet son homogenizados y la misma se coloca sobre una segunda columna de solución madre de ASB al 100.0% dentro de una jeringa, la cual sirve para efectuar un proceso de migración, con el fin de que se dé el desplazamiento diferencial de espermatozoides; en este caso se supone que los espermatozoides portadores de cromosoma Y avanzarían más rápido a través del medio elaborado con ASB, por tanto existiría una mayor proporción de estos, situándose en el fondo de la solución, en comparación de los espermatozoides portadores de cromosoma X que estarían situados en la parte más proximal de medio de ASB.

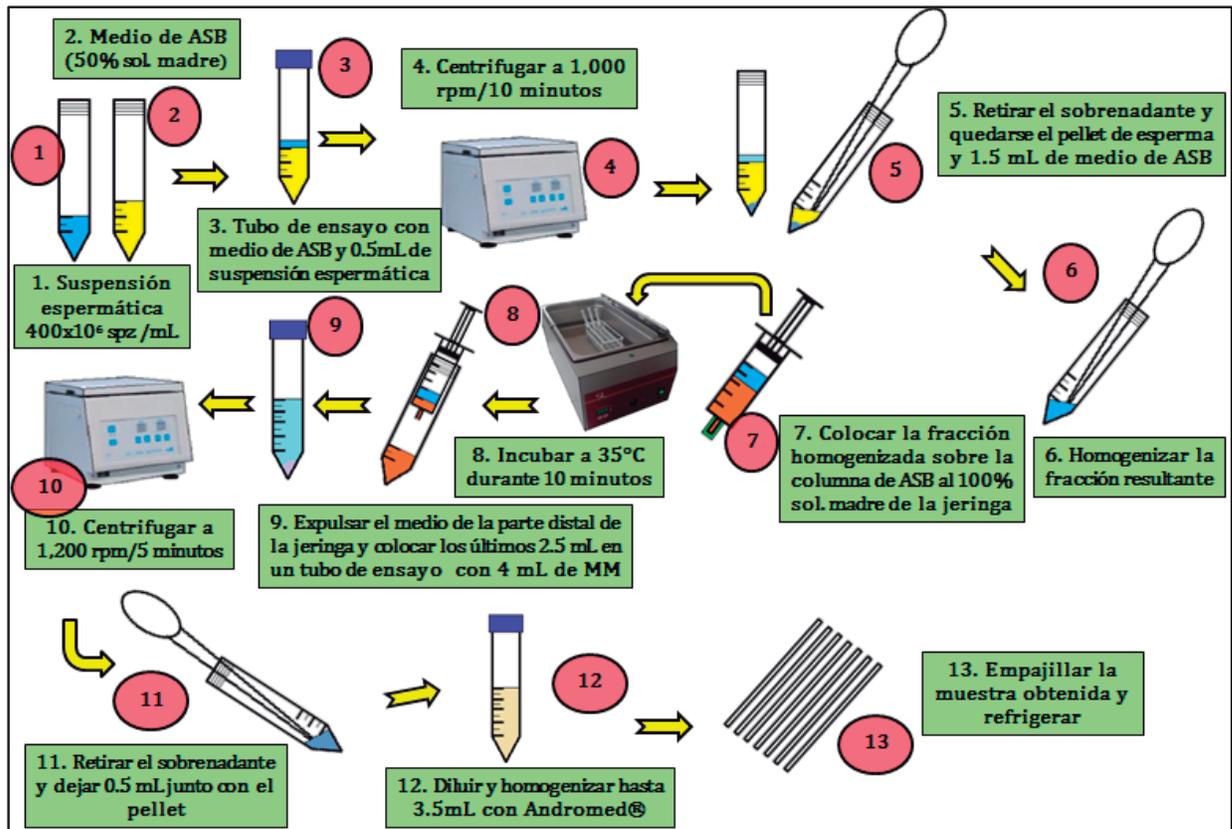
Al igual que en el método M1, también se utilizó aproximadamente 200×10^6 espermatozoides contenidos en un volumen de 0.5 mL de suspensión espermática de la misma muestra seminal que fue usada para todos los métodos propuestos.

El proceso detallado consistió en colocar la suspensión espermática de forma cuidadosa en un tubo de ensayo plástico con tapa rosca de 14 mL, al que previamente le fue añadido 4 mL de solución madre de ASB al 50%, temperada a medio ambiente de entre 20-22°C durante 10 minutos, luego de lo cual se le añadió la suspensión espermática la cual se encontraba a igual temperatura. Una vez comprobado que la suspensión espermática se encontraba claramente posicionada encima de la columna de ASB, esta se introdujo en una centrifuga con rotor fijo a 45° y se centrifugó a 1,000 RPM durante 10 minutos; luego de ello se retiró el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta graduable de 100 a 1,000 μ L; haciéndolo de forma cuidadosa hasta dejarlo en un volumen de 1.5 mL del medio correspondiente a la parte inferior que incluía al pellet de esperma, esta fracción fue homogenizada y se dejó en el tubo de ensayo; luego fue retirada del tubo para iniciar el proceso de migración en ASB.

La etapa de migración consistió en colocar la fracción recuperada del proceso anterior, en una jeringa a la que previamente le fue añadida un volumen de 2.0 mL de solución madre de ASB al 100.0%, haciéndolo de forma cuidadosa para evitar que ambas soluciones se mezclen; luego de ello la jeringa fue introducida en un baño maría permaneciendo en ángulo de inclinación de 30° y fue incubado durante 10 minutos a 35°C. Concluido el proceso de incubación, se retiró el tapón de la punta de la jeringa y se eliminó la primera fracción de la columna de ASB, correspondiendo a un volumen de 1.0 mL del medio situado más próximo a la punta de la jeringa, el resto del material equivalente a un

aproximado de 2.5 mL fue recuperado en un tubo de ensayo cónico rotulado y con tapa rosca; esta fracción se diluyó con 4.0 mL de medio de mantenimiento “MM” para luego proceder a centrifugarlo a razón de 1,200 RPM, durante 5 minutos, luego de ello se retiró el sobrenadante dejando únicamente un volumen de 0.5 mL correspondiente a la parte inferior que incluía al pellet de espermatozoides, esta parte fue nuevamente diluida con Andromed® hasta hacer un volumen final de 3.5 mL; la suspensión resultante se envasó en pajillas de 0.5 mL y se mantuvieron en refrigeración durante 20 a 24 horas, por último fueron sometidos a congelación en nitrógeno líquido, siguiendo el protocolo del Banco Nacional de Semen - UNALM.

Figura 2. Esquema para uso de ASB basado en el método propuesto de centrifugación y migración “M2”



c. METODO 3. DOBLE MIGRACIÓN “M3”

En este caso la forma de uso de ASB se basa únicamente en el concepto de las diferencias en las velocidades de migración por efecto de la variación en el tamaño que

implica una variación de la superficie celular entre los dos tipos de espermatozoides portadores de cromosomas X como Y, esto ocasiona que estas células tengan un desplazamiento diferencial cuando se colocan en el interior de una solución viscosa o densa como es el caso del medio elaborado con ASB; en esta situación las células más pequeñas portadoras del cromosoma Y, pueden desplazarse por el medio o la solución, sin generar mucha fricción y por lo tanto logren un mayor recorrido en comparación con las células portadoras del cromosoma X que por ser más grandes sufren una ralentización en su desplazamiento por efecto de la fricción, ello ocasiona que queden relegadas respecto del primer tipo de células. Como resultado de este procedimiento se podrían obtener dos grupos celulares, uno compuesto por una mayor proporción de espermatozoides portadores del cromosoma Y en la parte más distal de la columna de ASB, de donde se dejó la muestra inicial de esperma y otro grupo con una mayor proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X en la porción más proximal de donde fue dejada la muestra inicial de esperma.

El método propuesto “M3” consistió en someter las muestras espermáticas a un proceso de doble migración en gradientes de albumina sérica bovina “ASB”, la primera de ellas en un medio elaborado con 50.0% de solución madre de ASB y la segunda migración en un medio elaborado con 100.0% de solución madre de ASB. Para ello se utilizó aproximadamente 200×10^6 espermatozoides contenidos en un volumen de 0.5 mL de suspensión espermática, el cual se colocó cuidadosamente en una jeringa descartable de 10 mL, acondicionada para este trabajo; previamente a esta jeringa le fue añadida 4 mL de medio preparado con 50.0% solución madre de ASB y 50% de medio de mantenimiento “MM”, esta fue temperada a 20-22°C, durante 10 minutos, luego de lo cual se le añadió la suspensión espermática, la cual se encontraba a igual temperatura.

Una vez que se comprobó que la suspensión espermática se encontraba claramente posicionada sobre la columna de ASB, se introdujo en un baño maría en un ángulo aproximado de 30 grados, así fue incubada durante 15 minutos a 35°C; al término de ello se quitó el tapón de la punta de la jeringa y la primera fracción de la columna que correspondió a 1.2 mL más próxima a la punta de la jeringa fue eliminada; la segunda fracción correspondiente a un volumen de 1.5 mL, fue recuperada y colocada en un tubo cónico de 14.0 mL, para luego ser sometida a un nuevo proceso de incubación; finalmente

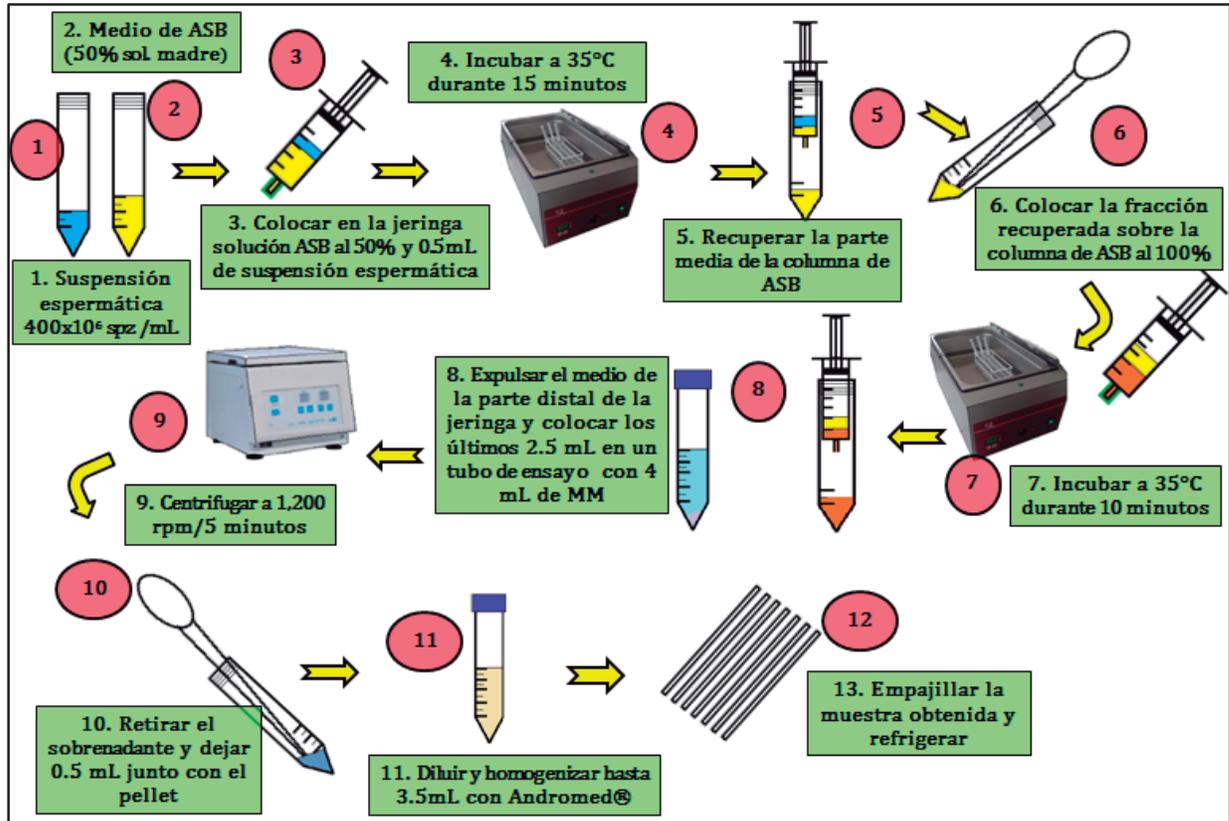
la tercera fracción que corresponde al resto del medio contenido en la jeringa fue también eliminada.

Para la segunda migración se utilizó la muestra recuperada del primer proceso de migración, esta fue colocada cuidadosamente en otra jeringa a la que previamente se le añadió 2.0 mL de solución madre de ASB. Esta jeringa fue colocada en un ángulo de inclinación de 30° en el baño maría y fue incubado durante 10 minutos a 35°C; concluido el proceso de incubación, se retiró el tapón de la punta de la jeringa y se eliminó la primera fracción de la gradiente, correspondiente a un volumen de 1.5 mL del medio más próximo a la punta de la jeringa, el resto del material equivalente a un aproximado de 2.0 mL, fue recuperado en un tubo de ensayo cónico rotulado con tapa rosca y se procedió a diluirlo con 4.0 mL de medio de mantenimiento, este fue colocado en una centrifuga con rotor fijo a 45° y fue sometido a centrifugación durante 5 minutos a 1,200RPM, luego de ello se retiró el sobrenadante quedando un volumen de 0.5 mL que contenía la pastilla o *pellet* de esperma; a esta fracción se le añadió dilutor Andromed® hasta tener un volumen final de 3.5 mL,

La muestra final fue envasada en pajillas de semen de 0.5 mL y mantenidas en refrigeración durante 20 a 24 horas luego de lo cual fueron sometidas a congelación utilizando para ello nitrógeno líquido, siguiendo el protocolo establecido en Banco Nacional de Semen – UNALM.

El proceso del método propuesto se grafica a continuación:

Figura 3. Esquema para uso de ASB basado en el método propuesto de doble migración “M3”



d. GRUPO CONTROL (M0)

Para el caso de las muestras usadas como control, se utilizó un volumen de 0.5 mL de suspensión espermática de la misma muestra utilizada para los métodos antes mencionados. Al igual que en los casos anteriores dicha fracción contenía una concentración aproximada de 200×10^6 espermatozoides en dicho volumen. Esta fracción fue colocada en un tubo de ensayo con tapa rosca y fue diluida con Andromed® hasta llegar a un volumen 3.5 mL, luego fue envasada en pajillas de 0.5 mL y se mantuvieron en refrigeración durante 20 a 24 horas, finalmente al concluir este período fueron sometidas a congelación en nitrógeno líquido junto con las muestras obtenidas mediante los métodos antes descritos.

3.3.5. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS

Las evaluaciones de las muestras obtenidas con los tres métodos propuestos para uso de ASB y con el control, se hicieron en tres momentos: (1) una vez concluidos los métodos propuestos, denominándose como “muestras frescas”; (2) con las muestras conservadas en refrigeración después 20-22 horas de efectuado el proceso, denominándose como “muestras refrigeradas” y (3) 24 horas después de haberlas sometido al proceso de congelación en nitrógeno líquido, denominándose “muestras congeladas”.

Las evaluaciones para determinar las características seminales se hicieron por medio de las siguientes técnicas de estudio citológico: (1) Recuperación espermática mediante *recuento con la ayuda de cámaras de Neubauer*; (2) *Tinción con quinacrina*, para determinar la presencia del cuerpo F y por tanto la proporción de espermatozoides con cromosoma Y (3) *Tinción compuesta con colorante Azul tripan – Solución Giemsa*, para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos - muertos y la reacción acrosómica de los mismos; (4) *Test de HOS*, para determinar la funcionalidad de la membrana plasmática. Las metodologías de las pruebas consideradas se describen a continuación:

a. TASA DE RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA

Para el caso de las muestras del grupo control y de las muestras obtenidas luego de la aplicación de los métodos tres propuestos para el uso de ASB, se utilizaron en cada caso una pajilla de 0.5 mL, de la cual se extrajo, una alícuota de 100 μ L.

Las alícuotas de dicha suspensión espermática que fueron diluidas con 300 μ L de agua bidestilada. Tendiendo un volumen diluido de 400 μ L, la ecuación utilizada para la estimación, fue la siguiente:

$$\text{Spz total} = (\text{N}^\circ \text{ Spz contados} / 0.028\text{mm}^3) * 1,000\text{mm}^3 * 4 * 3.5\text{mL}$$

Dónde:

Spz total = Número total de espermatozoides.

0.028 mm³ = Volumen en el que se efectuó el conteo de spz (7 cuadrículas 0.2x0.2x0.1 mm)

1,000 mm³ =	Volumen de un mL para proyectar la cantidad de spz a dicho volumen.
4 =	Factor de dilución (100 µL de suspensión espermática + 300 µL de agua bidestilada)
3.5mL =	Volumen de la suspensión espermática inicial (con las que se llenaron las 7 pajillas de 0.5 mL).

b. TINCIÓN CON QUINACRINA

Consiste en la aplicación de una técnica de estudio citológico que hace uso del colorante fluorescente quinacrina para identificar cromosomas humanos (Zech, 1969 en Böttcher, 1996). Esta técnica se utilizó para determinar la presencia del cuerpo F que no es otra cosa que la expresión fluorescente de la cromatina Y presente en las células interfásicas (Pearson & Bobrow, 1970) (Červenka et al., 1971), esta técnica fue aplicada a muestras espermáticas debido a que presentan la cromatina bastante compacta (Tates et al., 1975).

Para la aplicación de este método se utilizó la información de las técnicas descritas por Tates et al., (1975), Pearson & Bobrow, (1970), Červenka et al., (1971), Böttcher, (1996) y otros, en el método que se detalla a continuación:

- Se extrajo una alícuota de 500 µL de suspensión espermática de una pajilla de las muestras correspondientes tanto al control como a las obtenidas por el uso de ASB con los métodos propuestos, las mismas que se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido, para ello previamente fueron descongeladas en agua a 38°C durante 20 segundos.
- Se añadió una alícuota de 1,000 µL de solución salina fisiológica (SSF).
- La mezcla fue centrifugada a 2,000 RPM por tres minutos, para lavar la muestra espermática y retirar restos de ASB.
- La pastilla de espermatozoides obtenida fue resuspendida en SSF a su volumen original y fue nuevamente centrifugada a 2,000 RPM por otros tres minutos.
- La pastilla de espermatozoides obtenida fue resuspendida y homogenizada nuevamente en SSF, luego se efectuó un frotis el cual se expuso a corriente de aire para que se secase.

- Las láminas se fijaron en solución Carnoy durante 60 minutos y después se dejó expuesto a corriente de aire.
- Las láminas fijadas fueron sumergidas en un cubeta coplin que contenía Buffer McIlvanine's, durante cinco minutos, luego fueron retiradas para dejarlas secar en corriente de aire.
- Se colocaron las láminas en una cubeta coplin que contenía el colorante diclorhidrato de quinacrina al 0.5% disuelto en solución acuosa de etanol al 10%, la placa permaneció en este medio durante 30 minutos, cubriendo en todo momento la cubeta, con una caja oscura para evitar la incidencia de luz.
- Finalmente la lámina se lavó tres veces con Buffer McIlvanine's para retirar el exceso de colorante y cuando estaba húmedo se le colocó un portaobjetos para proceder a efectuar la observación.
- La lámina se examinó usando microscopio de fluorescencia con longitud de onda de 450 a 500 nm con un aumento de 40X en el lente objetivo y en ambiente oscuro.
- Se observaron de 100 a 140 células espermáticas por placa a fin de determinar la presencia del cuerpo F en los espermatozoides, la determinación se hizo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Spz con cuerpo F} = (\text{Nro. Spz con cuerpo F} / \text{Nro. Total Spz contados}) \times 100$$

c. TINCION COMPUESTA AZUL TRIPAN – SOLUCIÓN GIEMSA

Para efectuar la valoración de calidad seminal en términos de espermatozoides vivos/muertos y la reacción acrosómica, se utilizó la técnica citológica de tinción compuesta descrita por Kovács & Foote, (1992) la cual fue en parte modificada para esta investigación. La ventaja de esta técnica citológica es que permite determinar la cantidad de espermatozoides vivos y muertos así como los espermatozoides que han sufrido reacción acrosómica.

El procedimiento realizado se describe a continuación:

- La muestra de suspensión espermática de 200 µL fue colocada en un tubo cónico de 14 mL de capacidad al cual se le añadió 50 µL de colorante azul de tripán al 0.9% y fue cultivado durante 7 minutos a 35°C.

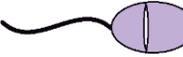
- De esta mezcla se extrajo una alícuota de 18 µL y colocó en el extremo de un cubreobjetos, se efectuó el frotis y se dejó secar rápidamente en la platina caliente exponiéndolo a corriente de aire.
- Las láminas con el frotis fueron fijados durante 10 minutos en solución de ácido acético al 12%.
- La láminas secas fueron lavadas tres veces con agua bidestilada a fin de eliminar el restos del ácido, colorante y otros restos no celulares y se dejó en posición vertical sobre un papel absorbente.
- Luego se colocó en una cubeta coplín de contenida solución Giemsa al 8%, permaneciendo en esta por un tiempo de 18-22 horas.
- Concluido el tiempo, las láminas fueron retiradas y lavadas tres veces en agua destilada para retirar el exceso de colorante y se dejaron secar en posición vertical sobre un papel absorbente.
- Una vez secos se procedieron a leer en microscópico de contraste de fases con un aumento de 40X en el objetivo.

El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI) se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Spz VAI} = (\text{Nro. Spz tipo I} / \text{Nro. Total de Spz de tipos I, II, III, IV}) \times 100$$

En el cuadro siguiente se muestra los criterios y clasificación de las células observadas.

Cuadro 3. Características de la muestra espermática sometida al proceso de tinción compuesta con azul tripan – solución Giemsa

	Espermatozoide vivo con acrosoma intacto "VAI"	Espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado "VAD"	Espermatozoide muerto con acrosoma intacto "MAI"	Espermatozoide muerto con reacción del acrosoma "MAD"
Acrosoma	Color azul-violeta	Translucido	Color azul-violeta	Translucido
Región post acrosomal	Translucido, ligeramente coloreado	Translucido, ligeramente coloreado	Azul oscuro – azul violeta	Azul oscuro – azul violeta
Imagen				
Tipo	I	II	III	IV

d. FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Se realizó mediante el test de *HOS*; esta prueba consistió en colocar una suspensión espermática en una solución hipo-osmótica para ello utilizaron variantes a las metodologías descritas por Jeyendran et al., (1984) además de Correa & Zavos, (1994), la cual se describe a continuación:

- Se colocó en un tubo de ensayo de 14 mL, una alícuota 25 μ L de la muestra recuperada con 200 μ L de solución hipo-osmótica de citrato de sodio equivalente a 100 mOsm y se dejó incubar durante 60 minutos a 36.0°C en baño maría.
- Concluido el tiempo de cultivo se añadió 200 μ L de metanol absoluto y se dejó en el baño maría durante otros cinco minutos.
- Luego se añadió 25 μ L de colorante eosina al 2% y se retiró del baño maría.
- Del fondo del tubo de ensayo se extrajeron 12 μ L del cultivo y se colocó sobre un portaobjetos, con ello se hizo un frotis el cual se dejó secar en una platina caliente y en corriente de aire.
- Finalmente se efectuó el conteo de dos campos y un aproximado de 100 espermatozoides por campo.

El criterio de evaluación fue el siguiente:

$$\% \text{ Spz HOS positivos} = (\text{Nro. de Spz con reacción} / \text{Nro. Total de Spz contados}) \times 100$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TASA DE RECUPERACION ESPERMÁTICA

Los resultados de la recuperación espermática, logrados luego del procesar las muestras en ASB con los métodos que fueron propuestos, así como sus respectivos valores de concentración espermática porcentual respecto del grupo control se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Número y porcentaje de espermatozoides recuperados con los diferentes métodos propuestos para uso de ASB

UNIDAD	MÉTODO			
	Control M0	Doble centrifugación M1	Centrifugación + migración M2	Doble migración hacia abajo M3
Promedio	201.25x10 ⁶ (a)	101.60x10 ⁶ (b)	72.28x10 ⁶ (c)	43.77x 10 ⁶ (d)
DE	20.45 x10 ⁶	9.40x10 ⁶	6.49x10 ⁶	4.31x10 ⁶
Como porcentaje	100.00%	50.69%	36.23%	21.41%

LEYENDA: Medias con igual letra no muestran diferencias estadísticas. DE: desviación estándar.

En cuanto al porcentaje de recuperación de espermatozoides, se observó una diferencia significativa en los porcentajes obtenidos con los tres métodos propuestos para el uso de ASB ($P < 0.01$), de ellos el valor promedio de recuperación para el método de doble centrifugación “M1” fue del 50.69% respecto del control, así mismo dicho resultado fue diferente y superior al valor porcentual obtenido con los otros dos métodos propuestos.

El porcentaje de recuperación logrado con el método de centrifugación más migración “M2” representó el 36.23% de la muestra inicial, dicha tasa de recuperación fue superior al porcentaje obtenido con el método de doble migración “M3” el cual fue del 21.41% de su muestra inicial, pero menor que el porcentaje de M1.

Los porcentajes de recuperación de M1 y M2 fueron muy superiores a los resultados obtenidos por Oliveira et al., (2011b) quienes trabajando con muestras seminales

criopreservadas de ganado bovino europeo en una técnica de centrifugación en gradientes continuas de densidad, pudieron recuperar un 6.5% de espermatozoides sexados, mientras que Correa et al., (1997) obtuvieron un promedio 16.7% con la técnica *swim up*; por otro lado Chen et al. (1997) efectuando tratamientos de migración-centrifugación, pudieron recuperar el 9.3% de espermatozoides, cuando el experimento se realizó a temperatura ambiente, dicha tasa se incrementó al 17.5% cuando se trabajó a 37°C.

Algo que se pudo observar en el caso de la centrifugación efectuada en M1 y M2, fue la formación de un pellet de regular tamaño, al fondo de los tubos preparados con ASB una vez concluido el tiempo de centrifugación, por ello se logró obtener un mayor porcentaje de espermatozoides. Se puede decir que incrementando el tiempo de centrifugación de las muestras permite obtener una mayor cantidad de espermatozoides, sin embargo la formación de pellet implica que los espermatozoides se aglutinen y ello ocasionó un fuerte deterioro de los mismos por la aglutinación, el enredo y ruptura de sus flagelos. En pruebas preliminares se pudo observar que al centrifugar por más de diez minutos se incrementó el tamaño del pellet, y también el deterioro de los espermatozoides.

En el caso del método M3 el porcentaje de células espermáticas recuperadas fue del 21.41%, el resultado fue más alto que el obtenido por Costa (2007) quien logró una tasa media de 18.3% en una técnica de migración *swim up*, mientras que Flaherty et al., (1997) pudieron recuperar una media del 11.1%. Además se pudieron revisar otras investigaciones como las de Rose & Wong (1998), quienes trabajando con muestras seminales humanas, mediante procedimientos de migración en ASH, lograron recuperar el 3.9% del total de espermatozoides procesados, por su parte Chen et al., (1997) lograron recuperar una media de 7.0% y 9.3% con dos procesos de migración en ASH efectuados a temperatura ambiente y con valores medios de 17.5% para tratamientos realizados a temperatura corporal humana.

La diferencia en el porcentaje de recuperación logrado con el M3 respecto a sus análogos al parecer se debe al tipo y al tiempo de migración en este estudio, ya que se efectuó una migración hacia abajo "*swim down*" y el tiempo total de la misma fue de 25 minutos, a una temperatura de 36°C, mientras que en los trabajos revisados se utilizaron periodos de migración más largos que van desde 45 minutos en gradientes continuas (Rose & Wong, 1998,) 1.5 horas (Chen et al., 1997), pero en esos casos se efectuaron migraciones hacia

arriba conocidas como “*swim up*”, que ocasiona la existencia de una menor cantidad de espermatozoides en las muestras más distales del núcleo de partida de las muestras que es un pellet previamente formado por sedimentación mediante centrifugación. En algunos experimentos de migración hacia arriba o *swim up*, se pudo obtener mayor cantidad de espermatozoides cuando estos migraban a temperaturas fisiológicas óptimas como el caso de Chen et al., (1997), que logró obtener el 17.5% respecto de la muestra inicial. No obstante cabe señalar que el mayor tiempo de permanencia en medios formados con albúmina, puede ocasionar alteraciones de la estructura de las membranas del espermatozoide esta situación será expuesta más adelante.

4.2. CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS EVALUADAS

4.2.1. VITALIDAD ESPERMÁTICA

Se analizaron los resultados de vitalidad utilizando el método de tinción compuesta de azul tripan – Giemsa, en las muestras empleadas para la aplicación de los métodos para uso de ASB, cuyos resultados se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Vitalidad espermática observada en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB

Momento de observación	Método para el uso de ASB			
	Control “M0”	Doble centrifugación “M1”	Centrifugación + migración “M2”	Doble migración “M3”
Muestras frescas	64.24% (a)	42.53% (b)	37.23% (b)	27.23%(c)
Muestras refrigeradas	56.38%(a)	41.87% (b)	30.38% (c)	29.79%(c)
Muestras congeladas	42.64%(a)	25.13% (b)	18.22% (c)	14.25%(c)

LEYENDA: Medias con igual letra en la misma fila no muestran diferencias estadísticas.

Del análisis de los resultados evaluados en un primer momento (muestras frescas) se observó la disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos tras ser sometidos a los tres métodos para uso de ASB que fueron propuestos ($P < 0.01$); en dicho análisis se determinó que el valor promedio del grupo control (64.24%) fue superior al resto de promedios, mientras que el promedio del grupo M1 (42.53%) fue similar al de M2

(37.23%) pero diferente y superior a los valores obtenidos con M3 (27.23%), y el promedio de M3 fue inferior al de M2.

En el caso de las muestras evaluadas en el segundo momento (muestras refrigeradas) se vio una reducción en el porcentaje de espermatozoides vivos en todos los casos respecto de los valores de sus respectivas muestras frescas; además de ello se observó que el grupo control mostró un valor promedio del 56.38% de espermatozoides vivos el cual fue superior al resto de promedios ($P < 0.01$), mientras que M1 obtuvo un promedio del 41.87%, siendo este resultado superior al obtenido con M2 que fue del 30.38% y con M3 que fue del 29.79%, sin embargo los resultados de M2 y M3 fueron estadísticamente iguales entre estos.

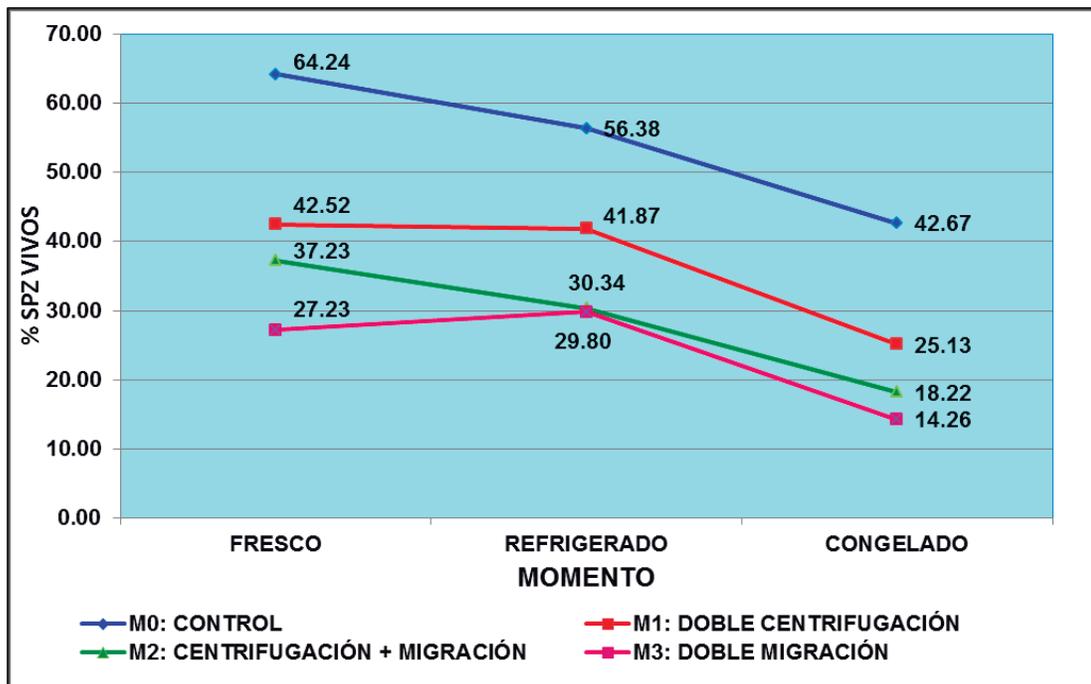
Para el caso de las muestras evaluadas en el tercer momento (muestras congeladas) también se observó una reducción substancial en todos los casos, respecto de sus respectivas muestras refrigeradas; del análisis estadístico se vio que del grupo control obtuvo un promedio de espermatozoides vivos que fue del 42.64%, dicho valor fue superior a los promedios obtenidos con las muestras sometidas a los diferentes métodos para uso de ASB ($P < 0.01$), en el mismo análisis se determinó que el grupo M1 obtuvo un promedio del 25.13% de espermatozoides vivos que fue superior y diferente de M2 y M3, los cuales tuvieron valores de 18.22% y 14.25% respectivamente, siendo estos últimos estadísticamente similares entre si.

Los resultados del análisis estadístico se muestran en la Figura 4, donde observa además el efecto de la variación en el porcentaje de espermatozoides vivos en función del momento de la evaluación.

De acuerdo a la revisión de investigaciones se observó que los resultados este estudio difieren de los presentados por Costa (2007) quien consiguió 61% y 69% de espermatozoides vivos en el grupo control y con el método de migración *swim up* respectivamente, por su parte Palomo (1995) en sus investigaciones sobre *FIV* con la técnica de migración *swim up*, logró mejorar el porcentaje de espermatozoides vivos de 63.0% en su control a 73.6% con el tratamiento, pero el mismo autor cuando utilizó la técnica de centrifugación en Ficoll, obtuvo resultados de vitalidad que fueron inferiores a su respectivo grupo control siendo de 50.6% y 61.3% para cada caso, además se vio que

después de incubar las muestras en heparina por 45 minutos, los resultados de vitalidad fueron de 85.3% con el método de *swim up*, 44.7% con la centrifugación en Ficoll y 52.5% en su grupo de control.

Figura 4. Porcentaje de espermatozoides vivos en base a los métodos propuestos para uso de uso de ASB y los momentos de evaluación



En el caso de las técnicas de migración tipo *swim up*, se ha observado a que en general estas mejoran las tasa de vitalidad de las muestras espermáticas respecto a sus valores iniciales ya que el principio aquí es el desplazamiento por propio movimientos de las células, mientras que en el caso de la sedimentación por centrifugación se han observado resultados más variables siendo que los valores de vitalidad en algunos casos son más altos y en otros menores (Palomo, 1995) ello al parecer depende del medio que se use para efectuar la sedimentación, el cual debe ser en general más denso para evitar los efectos negativos de la acción mecánica del proceso de centrifugación, pero además de esto, se han encontrado evidencias en investigaciones con semen de humano que demostraron que la sedimentación por centrifugación puede causar la producción de componentes de especies reactivas de oxígeno “ROS”, en el sedimento, lo que provocaría un daño irreversible en los espermatozoides, perjudicando su capacidad para ser utilizados en procesos de fecundación *in vitro* (Aitken & Clarkson, 1988).

Como se describió anteriormente los resultados del presente trabajo mostraron una reducción notable en el porcentaje de espermatozoides vivos en todos los grupos a los que se expuso al medio preparado con ASB. Por lo que se puede inferir que la exposición a dicho medio tuvo un efecto negativo sobre esta característica, sobre todo porque se esperaba que el grupo M1 mostrara resultados más bajos por la acción mecánica ejercida sobre las muestras, debido a la acción del procedimiento de centrifugación, sin embargo el mayor efecto deteriorante se dio en las muestras que estuvieron expuestas por más tiempo a las columnas de ASB.

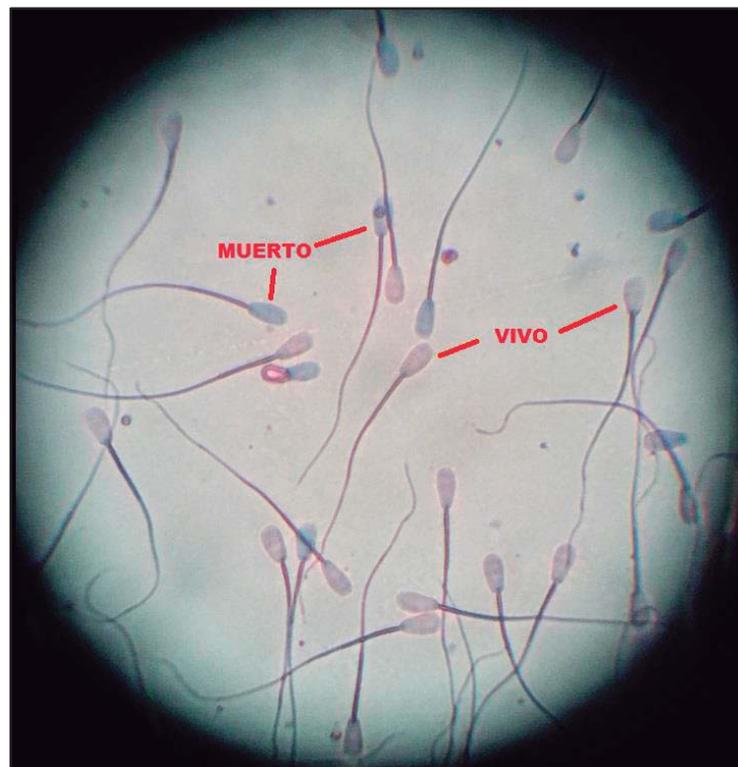
Cabe mencionar que en la etapa pre experimental de esta investigación, se pudo observar una reducción en la proporción de espermatozoides vivos la cual era provocada por el tiempo de exposición al medio de mantenimiento “MM” cuando este se comparó con el dilutor Andromed®; su implicancia radicó en el hecho de que el MM fue el utilizado en: (1) la etapa inicial de dilución de las muestras seminales, pudiendo así obtener la suspensión espermática de 400×10^6 spz/mL, permitiendo disminuir la densidad del semen en comparación con el Andromed® (2) como componente en la preparación de los gradientes de densidad, porque se trataba básicamente de un dilutor isotónico (3) en los lavados efectuados para retirar el exceso de ASB presente en las muestras recuperadas antes de su dilución con Andromed®.

En la etapa pre experimental, se comparó la efectividad del MM con el dilutor Andromed®, las muestras fueron conservadas en refrigeración durante 24 horas, con la evaluación llevada a cabo se mostró que el dilutor comercial mantuvo un mayor número de espermatozoides vivos y con motilidad aparente, respecto de las muestras diluidas con el MM desarrollado; sin embargo la posibilidad de utilización de Andromed® en todos los procedimientos fue descartada debido a que su uso como medio de lavado y extensor de las muestras, produjo una reacción negativa con la ASB, ocasionando el aglutinamiento y gelatinización del medio y ello no hacía posible el poder recuperar las muestras espermáticas presentes en dicha fracción.

También se tuvo el efecto del modo de conservación de las muestras, observándose un efecto negativo sobre todo cuando se examinaron las muestras que fueron congeladas en nitrógeno líquido; la reducción en el porcentaje de vitalidad probablemente se deba al deterioro de la membrana plasmática y la reducción en la capacidad de esta, para evitar

fractura por la formación de cristales de hielo en el interior de la célula como lo constataron Rubio-Guillen et al., (2007) quienes encontraron valores de vitalidad de 93.0% para muestras seminales frescas de toros y de 72.8% para muestras criopreservadas; el daño puede ser reducido con la aplicación de crioprotectores como el glicerol o etilenglicol en asociación con fructosa o glucosa, sin embargo y a pesar de ello el daño no puede eliminarse en su totalidad. Por lo tanto la reducción de vitalidad de las muestras procesadas con ASB hace que estas no sean capaces de ser utilizadas en procedimientos subsecuentes de conservación en nitrógeno líquido.

Figura 5. Fotografía de la coloración parcial con azul tripan – solución Giemsa para la observación de vitalidad espermática



Leyenda: región post-acrosomal azul: *espermatozoide muerto*;
región post-acrosomal transparente-ligeramente rosado:
espermatozoide vivo.

4.2.2. MOTILIDAD PROGRESIVA INDIVIDUAL

Se consideró evaluar esta característica debido a que nos permite tener una apreciación referencial sobre la proporción de espermatozoides viables observados en las muestras. La

motilidad progresiva individual (MPI) de la muestra se categorizó en una escala de valoración porcentual de 0% a 100% con cifra de discernimiento mínimo de 5% con tres observaciones por muestra y utilizando el promedio para el análisis respectivo.

Los resultados se observan en el siguiente cuadro.

Cuadro 6. Motilidad progresiva individual observada en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB

Momento de observación	Método para el uso de ASB			
	Control "M0"	Doble centrifugación "M1"	Centrifugación + migración "M2"	Doble migración "M3"
Muestras frescas	83.11% (a)	48.11% (b)	31.89% (c)	23.11% (d)
Muestras refrigeradas	84.45% (a)	46.22% (b)	27.33% (c)	17.56% (d)
Muestras congeladas	54.22% (a)	29.44% (b)	10.33% (c)	4.55% (c)

LEYENDA: Medias con igual letra en la misma fila no muestran diferencias estadísticas.

En el caso de las muestras frescas, el análisis de la información mostró la existencia de una diferencia altamente significativa entre los porcentajes de motilidad de los grupos evaluados ($P < 0.01$) y se observó un mayor porcentaje de motilidad cuando se utilizó ABS en el método de doble centrifugación "M1" el cual fue del 48.11%, siendo este resultado estadísticamente superior a aquellos obtenidos con "M2" y "M3" que tuvieron 31.89% y 23.11% respectivamente, los mismos que además fueron diferentes entre sí; sin embargo cabe precisar que los porcentajes de motilidad de los tres grupos expuestos a los métodos para uso de ASB, resultaron inferiores a los valores obtenidos del control (83.11%).

Respecto de las muestras que fueron evaluadas en el segundo momento (muestras refrigeradas) se encontraron diferencias altamente significativas entre los resultados obtenidos con los tres métodos para uso de ASB ($P < 0.01$) donde el valor del método M1 (46.22%) fue superior a los resultados de M2 (27.33%) y M3 (17.56%), por su parte el resultado de M2 fue diferente y superior al de M3. Los resultados de motilidad obtenidos con los tres métodos empleados, se mantuvieron muy por debajo de los resultados del grupo control que tuvo un promedio del 84.45% de MPI.

En el caso de las muestras evaluadas en el tercer momento (muestras congeladas); también se encontraron diferencias altamente significativas entre los métodos propuestos para el uso de ASB ($P < 0.01$); siendo el resultado de M1 (29.44%) superior los resultados de M2 (10.33%) y M3 (4.55%); así mismo se determinó que los resultados de M2 y M3 fueron estadísticamente similares entre sí. Además se mantuvo la condición de superioridad de las muestras del grupo control respecto de las muestras sometidas a los diferentes métodos propuestos para uso de ASB.

Los resultados de motilidad en esta investigación, difieren de los obtenidos por David et al., (1977) quienes observaron que la aplicación del tratamiento en ASB incrementaba notablemente el porcentaje de motilidad aparente, pasando del $56.5\% \pm 31\%$ en muestras no tratadas, al $92.7\% \pm 2.9\%$ en el promedio de muestras tratadas con ASB, en el mismo estudio se determinó que existía un incremento en el porcentaje de motilidad cuando se incrementaba la concentración de ASB en la gradiente o columna utilizada en metodologías de un sola migración, pasando de 60% con gradientes de ASB al 10% hasta 95% de motilidad cuando se utilizaban gradientes de ASB al 25%, esta condición no vario cuando se efectuaron metodologías de tres pasos siendo en todos los casos motilidades de 95% en las muestras tratadas; por su parte Beal et al., (1984) obtuvieron un $35\% \pm 11.5\%$ en muestras no tratadas y $60\% \pm 8.2\%$ en muestras procesadas con ASB, dichos resultados fueron obtenidos con muestras que previamente habían sido congeladas en nitrógeno líquido antes de su evaluación. En el caso de Chen et al., (1997) trabajando una metodología similar a M1 pero con muestras seminales humanas, pudieron encontrar valores del 64.0% y del 99.3% de motilidad para su grupo control y su tratamiento respectivamente, mientras que Flaherty et al., (1997) obtuvieron motilidades del 79% y 94% para sus grupos control y tratamiento; por su parte Correa et al., (1997) lograron recuperar fracciones con $86.5\% \pm 3.4$ con la técnica de migración *swim up*; mientras que Costa (2007) trabajando con semen bovino criopreservado y con la técnica de migración *swim up*, logró encontrar un promedio de motilidad del 65% y 80% para su grupo control y tratamiento respectivamente; por su parte Samardzija et al., (2006) utilizando la técnica de migración *swim up*, obtuvieron 70% de motilidad en las muestras tratadas; dicha cifra fue una de las más bajas, sin embargo representó un incremento del 20% respecto de las sus muestras iniciales. De los resultados de la revisión de investigaciones, se pudo observar la existencia de un incremento notable en la proporción de espermatozoides con motilidad, por efecto de los métodos de aplicados, sin embargo estos valores son

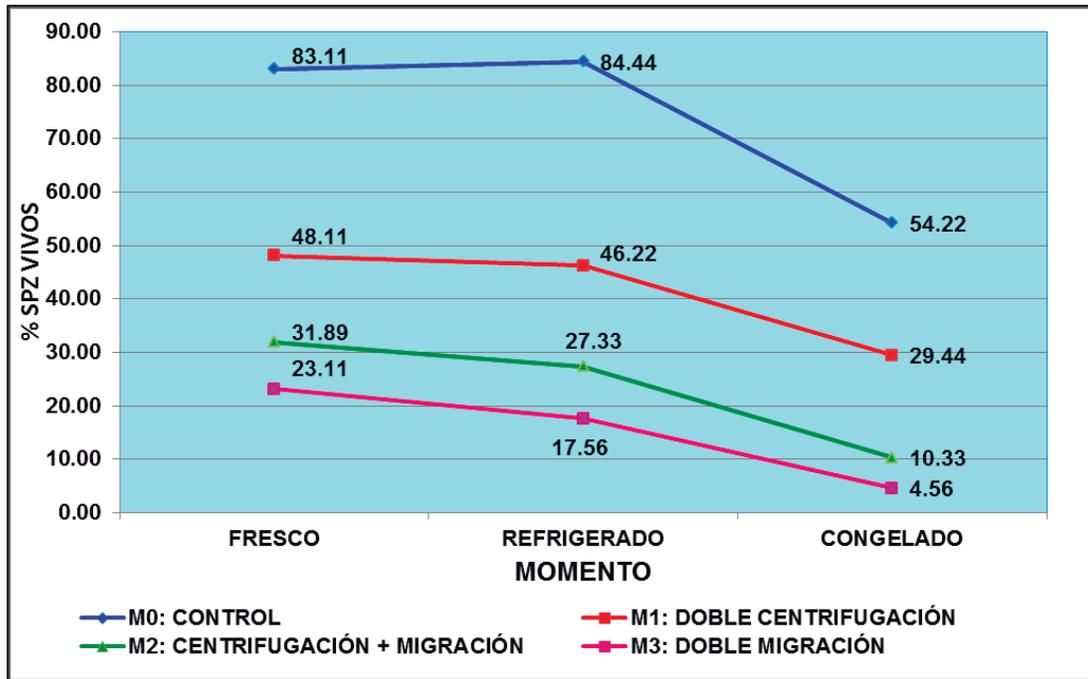
variables, dependiendo del porcentaje de motilidad inicial y del tipo de tratamiento o método de sexado empleado.

De la revisión de investigaciones mencionadas en general se observó que los métodos que hacen uso de procesos de migración traen como resultado mayores tasas de motilidad que aquellos que hacen uso de procesos de centrifugación, como se vio en el caso de la migración *swim up*; en este caso la separación se da por efecto mismo del movimiento celular, en ese sentido únicamente células motiles podrán avanzar en las gradientes; sin embargo en el caso del presente estudio, el método para uso de ASB análogo denominado “M3” únicamente permitió obtener valores de motilidad del 23.11%, cifra que es muy inferior a las presentadas por otros autores; es más a diferencia de los estudios que muestran la existencia de un incremento en la tasa de motilidad respecto de sus grupos de control, en el presente estudio se observó una notable reducción de esta condición por efecto del uso de ASB indistintamente del método propuesto para el desplazamiento físico. La tasa de motilidad de M3 fue incluso menor en comparación de los métodos que basan su principio en la centrifugación para lograr el avance de los espermatozoides en la columna de ASB, (M1 y M2); ello a pesar de que en experimentos de centrifugación preliminares se observó un fuerte efecto de deterioro producto de la centrifugación, que se dio por el enredo y ruptura de los flagelos de los espermatozoides que sucedía sobre todo cuando el tiempo y la velocidad excedían a los 10 minutos y 1,500 RPM respectivamente. Por tanto queda claro que en el presente experimento, que el efecto de deterioro en la motilidad de las muestras del grupo M3 y M2 respecto a M1 se debió sobre todo a al tiempo de permanencia en el medio de ASB y a la temperatura a la que fueron expuestas, más que al estrés debido proceso de desplazamiento mecánico o acción de la fuerza centrífuga.

No se pudieron comparar los resultados obtenidos con las muestras refrigeradas y congeladas, debido a la carencia de mayor información de este tipo en las investigaciones revisadas, salvo el caso de Beal et al., (1984) que fue expuesto anteriormente y se vio que se mantenía la superioridad en la motilidad de las muestras tratadas con ASB. En general las investigaciones sobre sexado espermático que hicieron uso de muestras humanas recuperadas fueron utilizadas directamente en procedimientos de fertilización *in vitro* FIV; y en el caso de muestras animales, se utilizaron muestras que previamente habían sido congeladas; pero queda claro que existe una reducción en la tasa de motilidad que se dio

por el efecto del congelamiento en nitrógeno líquido; al parecer el hecho de estar expuestos a los medios de ASB y las formas de desplazamiento, ocasionaron una reducción en la resistencia a los cambios de temperatura y de supervivencia a tras ser congeladas en nitrógeno líquido para su posterior uso.

Figura 6. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en base a los métodos propuestos para uso de ASB y los momentos de evaluación



4.2.3. FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA

La evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática permite determinar el efecto de deterioro de la capacidad fisiológica y de interacción de los espermatozoides, los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 7 y de forma gráfica en la Figura 6.

Del análisis efectuado con los resultados de las muestras frescas, se encontró que el grupo control tuvo un promedio de 64.62% espermatozoides con membrana funcional, dicho valor fue superior al de las muestras que fueron sometidas a los diferentes métodos para uso de ASB ($P < 0.01$), sin embargo no existió una diferencia substancial entre los promedios obtenidos para M1 (42.74%), M2 (42.58%) y M3 (39.63%).

Cuadro 7. Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional observado en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB

Momento de observación	Método para el uso de ASB			
	Control "M0"	Doble centrifugación "M1"	Centrifugación + migración "M2"	Doble migración "M3"
Muestras frescas	64.62% (a)	42.74% (b)	42.58% (b)	39.63% (b)
Muestras refrigeradas	60.64% (a)	44.71% (b)	42.22% (bc)	37.52% (c)
Muestras congeladas	46.07% (a)	41.43% (b)	39.17% (b)	39.14% (b)

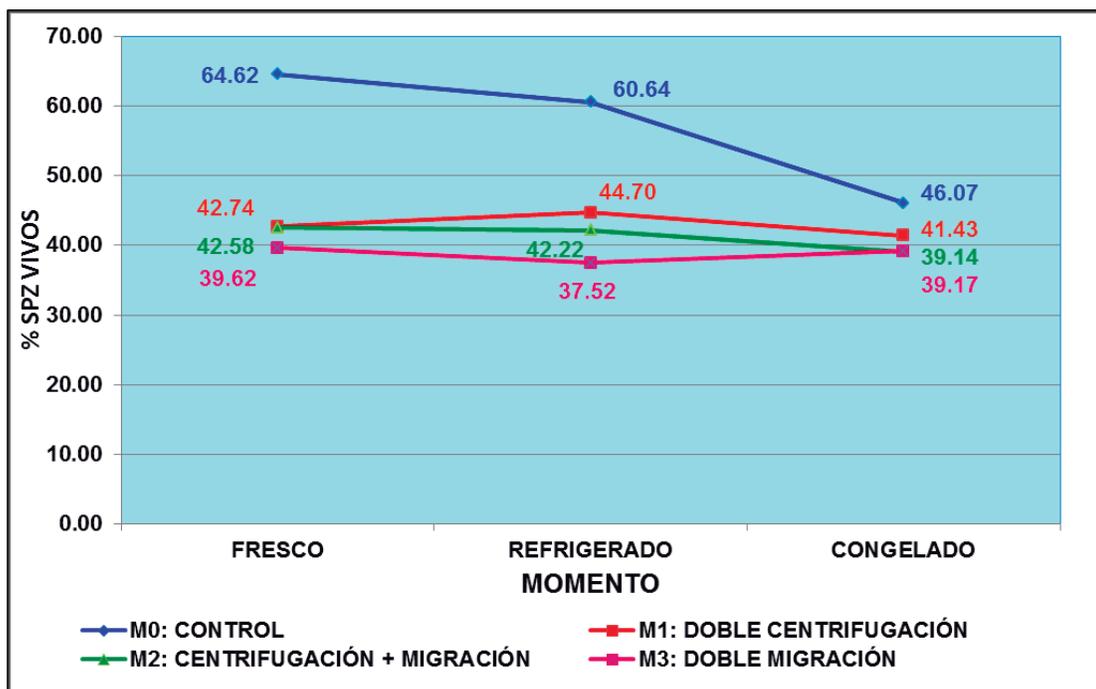
LEYENDA: Medias con igual letra en la misma fila no muestran diferencias estadísticas.

En lo que se refiere a las muestras evaluadas en el segundo momento, se observó que el grupo control mantenía un promedio de espermatozoides con membrana funcional (60.64%) superior al promedio obtenido con los diferentes métodos para uso de ASB ($P < 0.01$). además se vio que el grupo M1 tuvo un promedio de 44.71% de espermatozoides con membrana funcional, el cual fue superior a M3 (37.52%); pero no fue estadísticamente diferente del promedio obtenido con M2 (42.22%).

Por su parte observando las muestras congeladas, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos M1 (41.43%) M2 (39.17%) y M3 (39.14%), sin embargo estos fueron inferiores al promedio del grupo control que se mantuvo en un 46.07% de espermatozoides con membrana funcional ($P < 0.01$).

En el siguiente gráfico se observa que la reducción en el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional de acuerdo al momento de la evaluación, la cual como se ve, ocurre únicamente en el caso del grupo control y se dio sobre todo al ser congeladas en nitrógeno líquido. En el caso de las muestras obtenidas con los diferentes métodos que implicaron el uso de ASB, no se observó una reducción substancial en esta característica, tras ser mantenidas en refrigeración o ser congeladas en nitrógeno líquido.

Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional en base a los métodos propuestos para uso de ASB y los momentos de evaluación



En cuanto a los resultados de otras investigaciones, se tiene a Correa et al., (1997) que obtuvieron 26.5% y 44.0% para los grupos control y *swim up* respectivamente; mientras que Samardzija et al., (2006) obtuvieron $39.9\% \pm 8.9$ y $45.9\% \pm 1.8$, para sus grupos control y *swim up*; por su parte Oliveira et al., (2011a) realizando una prueba de integridad de membrana plasmática mediante técnicas citológicas de fluorescencia, obtuvieron valores de $59.1\% \pm 2.2$ y $72.3\% \pm 2.1$, para los grupos control y de centrifugación en gradientes de Percoll® respectivamente. Los resultados citados previamente son similares a otras investigaciones revisadas, en las que se observó un incremento en la proporción de espermatozoides con membrana plasmática funcional para los grupos sometidos a los diferentes métodos de sexado respecto a sus controles; en todos esos casos, las evaluaciones se efectuaron una vez concluido el proceso de sexado y en algunos de ellos las muestras obtenidas fueron utilizadas para realizar trabajos de *fertilización in vitro*.

Los resultados de la presente investigación muestran una reducción en el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional en todas las muestras que fueron procesadas en ASB indistintamente del método utilizado, sin embargo la reducción que se observó en el primer momento de la evaluación, no se varió cuando se evaluó en los

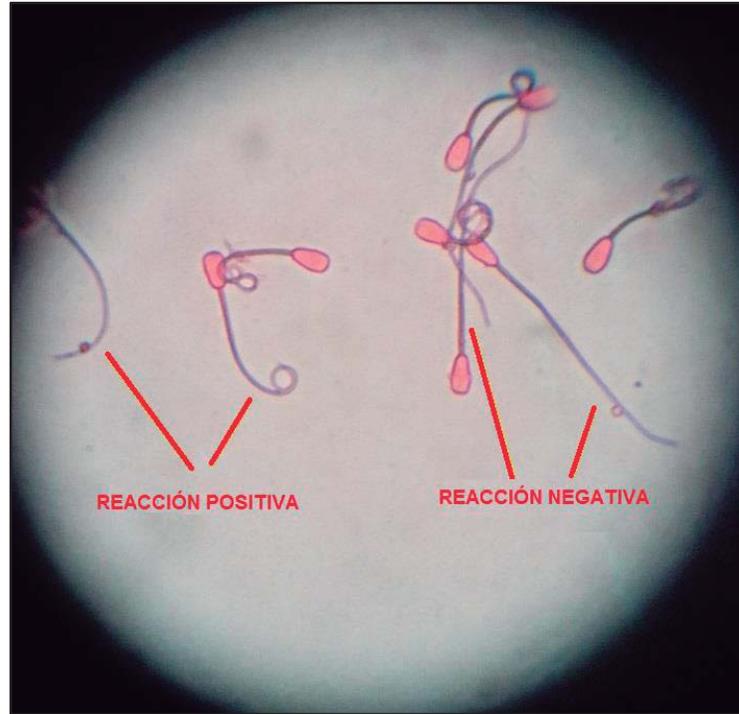
siguientes momentos de la investigación, únicamente en el caso del grupo control se observó una reducción acumulada del 18.55%, que se dio hasta la evaluación post congelación en nitrógeno líquido.

Es posible que el tiempo de exposición inicial de las muestras al medio de mantenimiento “MM”, a las columnas de ASB, así como la temperatura de migración, hayan ocasionado un efecto deletéreo sobre las células espermáticas, por tener que permanecer en estas condiciones durante el tiempo de procesamiento de las mismas. En el caso del método para uso de ASB denominado M3, se desarrolló con la idea de reducir los efectos negativos por alguna causa mecánica y/o aplicación de fuerza centrífuga prolongada, sin embargo el deterioro en la proporción de espermatozoides con membrana plasmática funcional fue similar al obtenido con los otros métodos que si hicieron uso de procesos de centrifugación, por lo que la reducción en las dos primeras etapas se debió principalmente al tiempo de exposición a las columnas de ASB y al medio de mantenimiento. En el caso de M2 y M1 aunque existió acción mecánica por la aplicación de fuerza centrífuga, esta no ocasionó un deterioro superior al observado con M3, por lo que se puede inferir que la acción mecánica no fue significativa para incrementar el grado de deterioro en esta característica más de lo que lo hizo, el exponer las muestras a la ASB; en ese sentido y tal como refirieron Palomo (1995); Bötcher, (1996); Hossepian de Lima, (1998); Palma, (2001); Samardzija et al.,(2006) y Costa, (2007), se puede atribuir que el deterioro en la condición se debe al proceso de capacitación ocurrida cuando las muestras seminales son sometidas a procedimientos de migración y centrifugación en gradientes o columnas de alta densidad, como las que se utilizaron en este estudio; por lo tanto procedimiento en general ocasionaría la alteración de los componentes de la membrana plasmática, como son las proteínas periféricas, fosfolípidos y colesterol, sobre todo el eflujo de este último incrementa la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares, ello ocurre cuando la célula es expuesta a medios que contienen albúmina y otros elementos como lipoproteínas de alta densidad (Parks & Ehrenwald, 1990).

En el caso de las proteínas de la membrana celular, Perez-Pé et al., (1998), efectuaron un experimento en el que añadieron proteínas plasmáticas a muestras espermáticas sometidas a procesos de criopreservación, lo que ocasionó el incremento en la proporción de espermatozoides con membrana plasmática funcional respecto de su grupo control.

Por tanto es posible que las membranas de las células espermáticas utilizadas en este experimento, hayan reaccionado con la ASB de las columnas, ocasionando un cambio en su estructura, haciéndolas más susceptibles a las condiciones de conservación e incapaces de soportar adecuadamente el proceso de congelación.

Figura 8. Fotografía de espermatozoides sometidos al test de HOS, para determinar la funcionalidad de membrana plasmática



4.2.4. ESPERMATOZOIDES VIVOS CON ACROSOMA NO REACCIONADO

Para evaluar esta característica espermática se consideraron a los espermatozoides vivos que mostraban el acrosoma no reaccionado, en todas las muestras obtenidas con los diferentes métodos para uso de ASB, los resultados se presentan en el Cuadro 8.

En el caso de las muestras frescas, se observó que el grupo control mantuvo un promedio de 58.12% de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado, pero en las muestras que fueron procesadas con ASB mediante los diferentes métodos propuestos, se observó una reducción significativa ($P < 0.01$), siendo que el grupo M1 conservó únicamente el 35.10%, dicho promedio fue estadísticamente similar a M2 que mantuvo el 30.16%,

mientras que M3 mostró el peor efecto sobre esta característica ya que solo se encontró al 20.48% de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado, siendo este resultado inferior al de los promedios obtenidos con M1 y M2.

Cuadro 8. Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB

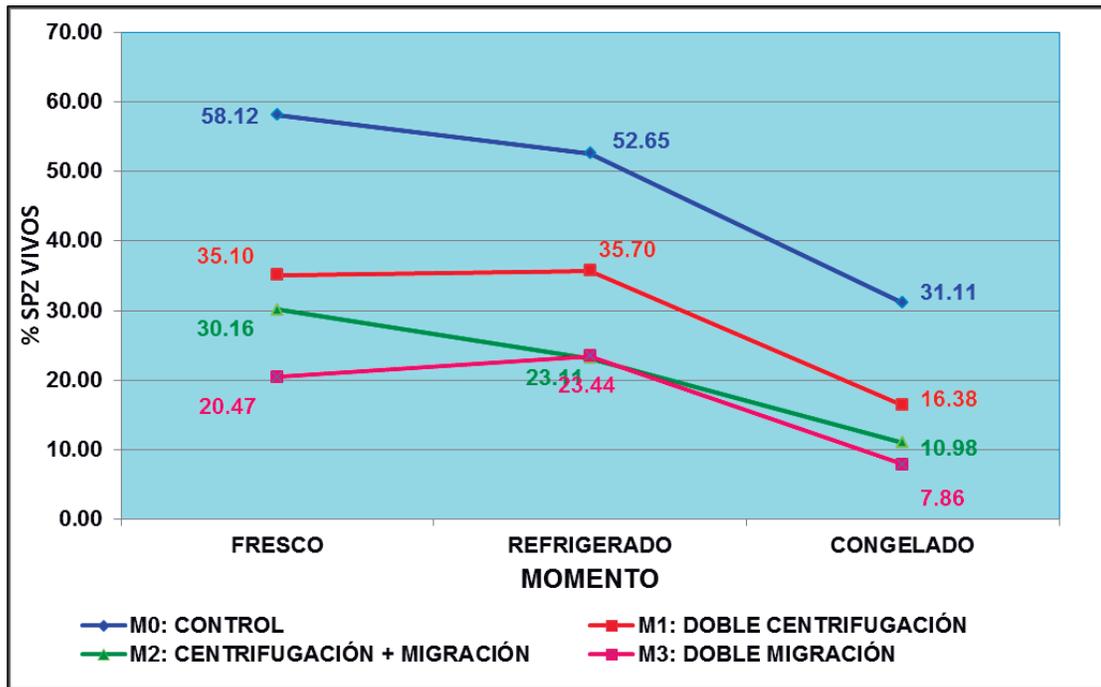
Momento de observación	Método para el uso de ASB			
	Control "M0"	Doble centrifugación "M1"	Centrifugación + migración "M2"	Doble migración "M3"
Muestras frescas	58.12% (a)	35.10% (b)	30.16% (b)	20.48% (c)
Muestras refrigeradas	52.65% (a)	35.70% (b)	23.44% (c)	23.11% (c)
Muestras congeladas	31.11% (a)	16.38% (b)	10.98% (bc)	7.86% (c)

LEYENDA: Medias con igual letra en la misma fila no muestran diferencias estadísticas.

Con respecto a las muestras que refrigeradas, el grupo control mantuvo un promedio de 52.65% de espermatozoides con acrosoma no reaccionado, dicho valor fue superior al promedio obtenido a con los tres métodos para uso de ASB propuestos ($P < 0.01$); de los resultados de correspondientes a los diferentes métodos, se determinó que M1 pudo conservar el 35.70%, dicho porcentaje fue superior a los obtenidos con M2 (23,44%) y M3 (23.11%) que a su vez fueron estadísticamente iguales entre ellos.

En el caso de las muestras que fueron congeladas en nitrógeno líquido, se observó una reducción marcada del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado en todos los grupos; en el caso del control mantuvo un porcentaje correspondiente al 31.11%, dicho valor se mantuvo superior al promedio obtenido con las muestras que fueron expuestas a ASB ($P < 0.01$), de estos últimos M1 pudo conservar el 16.38%, mientras que M2 conservó el 10.98%, ambos fueron estadísticamente iguales entre ellos, mientras que valor de M3 (7.86%) siendo estadísticamente similar al obtenido con M2.

Figura 9. Porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado, en base a los métodos propuestos para uso de ASB y los momentos de evaluación



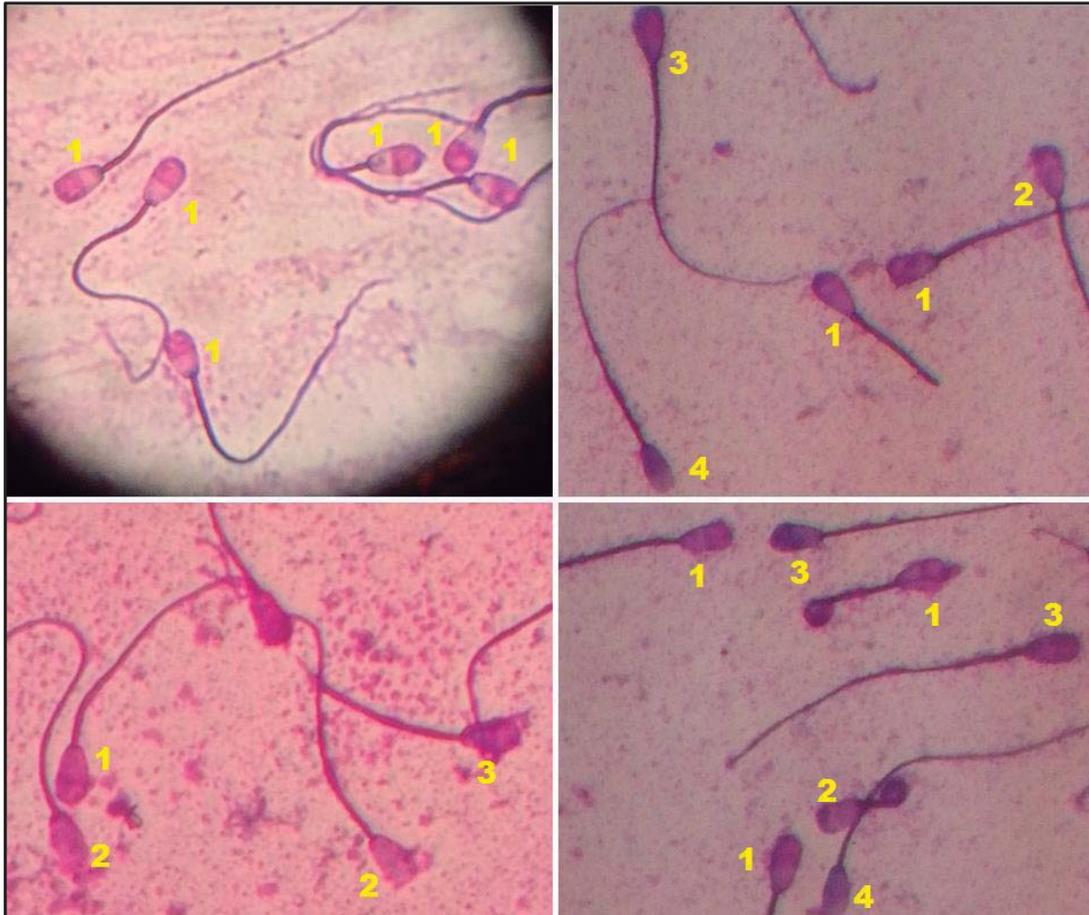
En diversas investigaciones evaluaron la cantidad de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado o intacto, para saber cómo este carácter podía ser afectado por los procedimientos de manipulación o capacitación efectuados, en tal sentido Resende et al., (2009) encontraron valores de espermatozoides vivos con acrosoma intacto o no reaccionado “VAI” de 10 y 19% para los grupos de control y los tratados mediante centrifugación en gradientes Percoll® respectivamente, mostrando una mejora en la calidad de este grupo por efecto del tratamiento; ese resultado fue contrario al obtenido por Costa, (2007) quien utilizando una técnica de centrifugación en gradientes de densidad, recuperó en promedio del 71.85% de espermatozoides vivos sin acrosoma “VSA” y 7% de espermatozoides VAI, el mismo autor utilizando la técnica *swim up*, logró recuperar un promedio de 9.75% espermatozoides VAI y 59.25% espermatozoides VSA, señaló además que esas técnicas promovían el incremento de espermatozoides que sufrían una capacitación prematura y que el protocolo de centrifugación utilizado ocasionó un incremento del porcentaje de espermatozoides con membrana acrosomal dañada; por su parte Oliveria et al., (2011) realizando estudios de fluorescencia, evaluaron el efecto del uso de gradientes de Percoll® sobre características celulares análogas, hallando 59% de

espermatozoides con acrosoma intacto y alta funcionalidad mitocondrial, en su grupo control, mientras que para el tratamiento utilizado el valor hallado fue del 38.2%

Al igual que en el caso de evaluación de la membrana plasmática, la membrana acrosómica al estar expuesta al medio de mantenimiento y a las columnas de ASB, sufrió un deterioro estructural, lo que ocasionó la reacción acrosómica prematura conocida como falsa reacción acrosómica, esto se demuestra con los resultados de la presente investigación, en la que se vio al grupo control conservando un promedio del 58.12% y 52.65% de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado o "VAI" tanto en muestras frescas y refrigeradas; dichos valores son más altos que los promedios obtenidos con los métodos M1 (35.10% y 35.70%), M2 (30.16% y 23.11%) y M3 (20.47% y 23.44%); sin embargo a diferencia del caso de la membrana plasmática, el acrosoma resultó afectado en mayor proporción en todos los casos.

Respecto al efecto del proceso de congelación, este ocasionó una reducción en la proporción de espermatozoides vivos con acrosoma no reaccionado en todos los grupos espermáticos evaluados, se debió principalmente a la fractura de las membranas celulares, que se produjeron por efecto de la formación de cristales de agua; por citar un ejemplo Rubio-Guillen et al., (2007) observaron una reducción en la población de espermatozoides VAI del 88.8% en muestras frescas al 52.2% en muestras congeladas, representando una reducción global del 41.2%. En el caso de este experimento se encontró una reducción del porcentaje de espermatozoides VAI, de 52.65% a 31.11% en el grupo control, ello representó una reducción del 40.92%, respecto de las muestras refrigeradas; mientras que M1 (16.38%) mostró una reducción general del 54.11%, respecto de las muestras refrigeradas, a su vez en el caso de M2 (10.98%) la reducción general fue del 52.49% y por último M3 (7.86%) tuvo una reducción general del 66.47%, respecto a las muestras refrigeradas; estas variaciones fueron ocasionadas por someter las muestras a congelación, por lo que su efecto en la reducción de muestras espermáticas viables, fue muy perjudicial.

Figura 10. Fotografía de espermatozoides coloreados con tinción compuesta azul tripan –Giemsa para observar la reacción acrosómica



LEYENDA: 1: vivo con acrosoma intacto “VAI”; 2: vivo con acrosoma dañado “VAD”; 3: muerto con acrosoma intacto “MAI”; 4: muerto con acrosoma dañado “MAD”.

4.3. SEPARACIÓN ESPERMÁTICA LOGRADA

Se efectuó el análisis de varianza de los datos referidos a la observación de espermatozoides con cromatina Y denominado *cuero F*, obtenidos con una tinción fluorescente de diclorhidrato quinacrina, aplicadas sobre las muestras espermáticas obtenidas con los métodos para uso de ASB propuestos; dichas muestras fueron evaluadas después ser congeladas en nitrógeno líquido. Los resultados se muestran en el cuadro 9.

Del análisis efectuado, se determinó la no existencia de diferencias significativas ($P>0.05$) entre los promedios de las muestras del grupo control ($48.4\% \pm 5.93$) y aquellas obtenidas con los tres métodos propuestos para el uso de ASB, de estos resultados con M1

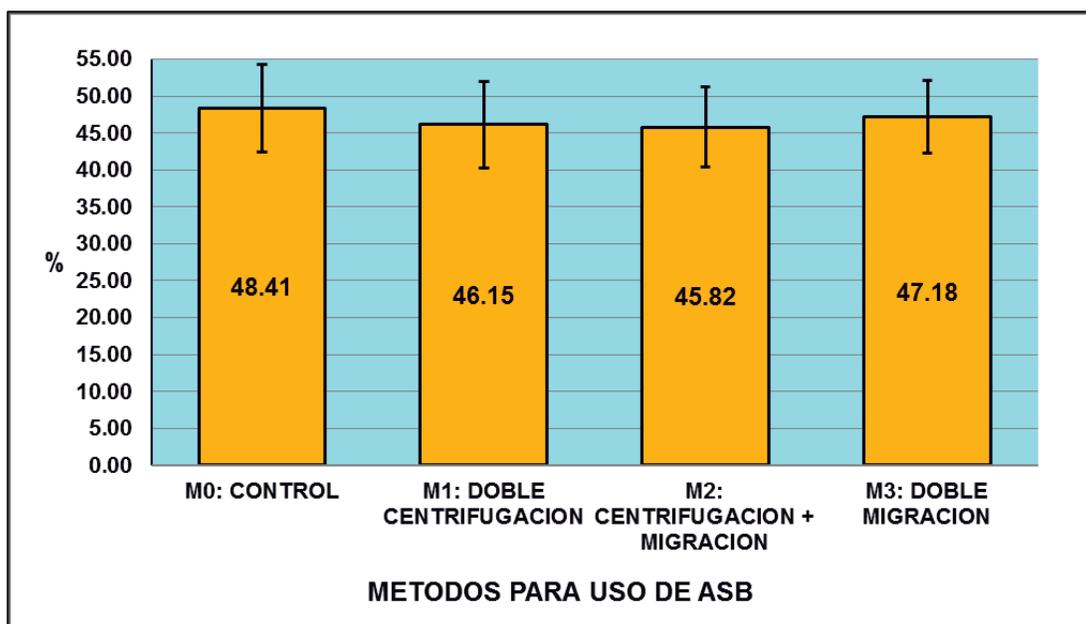
se obtuvo el 46.15% \pm 5.86; el promedio de M2 fue del 45.82% \pm 5.47 y con M3 se tuvo un valor del 47.18% \pm 4.92; aunque se observa una pequeña diferencia numérica entre estos, la desviación estándar fue alta en todos los casos.

Cuadro 9. Porcentaje de espermatozoides con cuerpo F en muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB

Momento de observación	Método para el uso de ASB			
	Control "M0"	Doble centrifugación "M1"	Centrifugación + migración "M2"	Doble migración "M3"
Muestras congeladas \pm DE	48.41% (a) \pm 5.93%	46.15% (a) \pm 5.86%	45.82% (a) \pm 5.47%	47.18% (a) \pm 4.92%

LEYENDA: Medias con igual letra no muestran diferencias estadísticas.

Figura 11. Porcentaje de espermatozoides con cuerpo F (cromatina Y) obtenidos con los métodos propuestos para uso de ASB



Los resultados obtenidos difieren de algunos de los trabajos en los que se hizo uso de gradientes de densidad en base a Percoll® o albúminas. Tomando en cuenta únicamente los trabajos en los que se utilizó albúminas como medio de separación tenemos a Ericsson et al., (1973) quienes lograron separar fracciones con hasta 85.0% de espermatozoides con cromosoma Y, en gradientes de 20% de ASB; David et al., (1977) encontraron un

incremento significativo en las muestras espermáticas que fueron tratadas con ASB pasando de 41.5% \pm 1.7% al 55.3% \pm 1.4%. mientras que Corson et al., (1984) replicando la metodología desarrollada por Ericsson et al., (1973) obtuvieron muestras espermáticas, con las que se logró obtener 28 varones de un total de 35 concepciones; por su parte Hernández et al., (2008) obtuvieron 72.7% de crías machos producto de la inseminación de conejas con la fracción de espermatozoides que se encontraron en una gradiente de 20% de ASH; Chen et al., (1997) evaluaron el grado de sexado logrado con el uso de gradientes de ASH, consiguiendo un incremento ligero pero significativo a favor de espermatozoides con cromosoma X; Rose & Wong (1998) lograron una variación de 3% en la proporción de espermatozoides X e Y presentes en las muestras recuperadas, lo que resultó significativo para dicho estudio. En otra investigación llevada a cabo por Hadi & Al-Timimi (2013) con semen de ovinos pudieron incrementar la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma Y, al 72.7% y al 54.5% usando columnas de ASB al 8% en procedimientos de migración y centrifugación con 200G y 300G respectivamente, dichos porcentajes se incrementaron al 81.8% y 63.6% cuando se utilizaron columnas en bifase de 16% y 8% de ASB.

Pero además existen otras investigaciones que mostraron resultados que son equiparables a los obtenidos con el presente estudio, en tal sentido se puede citar a Beal et al., (1984) quienes utilizaron gradientes discontinuos de ASB para producir muestras espermáticas con las cuales se inseminaron 182 vacas, el resultado de la proporción del sexo masculino fue del 45% (54 de 119) comparado al 54% (29 de 54) logrado con muestras seminales no procesadas, la diferencia porcentual observada no fue significativa ($P < 0.25$) para el estudio, en el mismo además se evaluó la variación de la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma Y mediante la técnica de citometría de flujo, no encontrándose un variación por efecto del tratamiento con ASB. En otra investigación realizada por Zavos (1985) utilizando muestras espermáticas de conejos resultantes del proceso de sedimentación en albumina se pudo conseguir el 55.3% de gazapos machos, de un total de nueve camadas, mientras que con montas naturales se obtuvo el 52.8% de gazapos machos de un total de 21 camadas evaluadas, ambos porcentajes no fueron diferentes entre ellos ($P > 0.05$); por su parte Ueda & Yanagimachi, (1987), efectuaron un experimento replicando la metodología desarrollada por Ericsson *et al.*, (1973) y obtuvieron un promedio de 45.8% (rango de 35.5% a 66.5%) de espermatozoides con cuerpos F luego de ser tratadas con albúmina, mientras que en la evaluación de control, el promedio fue de 43.1% (rango de

36.1% a 48.8%), encontrado una diferencia significativa pero muy leve, además presentaron un rango de variación muy alto por lo cual los autores pusieron en duda la efectividad del método para lograr un incremento en la proporción de espermatozoides con el cromosoma Y. En otra investigación realizada por Flaherty et al., (1997) utilizando técnica de centrifugación en albúmina, no lograron encontrar diferencias estadísticas en la proporción de espermatozoides portadores de uno u otro cromosoma.

Los resultados de las investigaciones que fueron expuestas mostraron contradicciones en cuanto a la efectividad del uso de la ASB como medio para conseguir una variación en la proporción a favor de espermatozoides portadores del cromosoma Y, dicha variación en los resultados podría deberse a factores como son la acción del ASB sobre las características fisiológicas espermáticas, más que al efecto de su capacidad de separación espermática (Björndahl & Barratt, 2002), otro factor se debería al método de evaluación empleado para determinar el porcentaje de separación espermática que fue logrado, habiendo técnicas directas como: la coloración con Quinacrina (Böttcher, 1996) que fue utilizada en esta investigación; la evaluación del cariotipo sexual mediante citometría de flujo (Beckett, et al., 1989); el método de hibridación *in situ* “ISH” (Guttenbach & Schmid, 1990); hibridación con fluorescencia *in situ* “FISH” (Viloria, 2008); evaluación indirecta por PCR de embriones tras efectuar procedimientos de *FIV* (Costa, 2008) (Hadi & Al-Timimi, 2013) y también observando la proporción de nacimientos de uno y otro sexo (Schilling, 1966) (Beal et al., 1984) (Hernández, 2008), esta última es utilizada sobre todo en especies de ciclo de vida corto y en humanos.

En cuanto al método de tinción con quinacrina que fue empleado en este estudio se discute sobre la efectividad de dicho colorante como marcador del cromosoma Y; por un lado se consideró la capacidad del colorante para fijarse al cromosoma Y, la cual fue demostrada mediante diversas investigaciones realizadas sobre células diploides así como espermatozoides de humanos y otras especies animales; cabe mencionar que esta técnica se originó como un método para determinar el cariotipo celular denominado bandeo “Q” cuyas bandas brillantes observables corresponden a las bandas oscuras obtenidas con el bandeo “G”, las cuales corresponden a regiones de heterocromatina formada por cadenas de adenina-timina (A,T), presente en gran cantidad en el brazo “q” del cromosoma Y (Korn, 1978) esta condición, motivo su uso como prueba rápida para observar la presencia cromosoma sexual Y, casos de disomía de dicho cromosoma y otras evaluaciones que

fueron utilizadas en los años setenta y ochenta (Pearson & Bobrow, 1970) (Červenka, et al., 1971) (Tates et al., 1975) (Korn, 1978) (Böttcher, 1996), antes del desarrollo de sondas específicas para determinar regiones de los diferentes cromosomas en técnicas de ISH o FISH las cuales son bastante precisas pero de mucho mayor complejidad.

Otro aspecto que se discute es la fiabilidad de la tinción con quinacrina porque se reportaron resultados que implicaron una alta variabilidad de los mismos; en el caso de Beckett *et al.*, (1989) observó una alta variabilidad entre los resultados del cuerpo F y ADN específico masculino, no encontrando correlación entre estos, por su parte Blottner et al., (1992) encontraron una frecuencia de 41.5% \pm 5.1% de cuerpos F, en 35 eyaculados provenientes de 22 toros, sin embargo presentaron un coeficiente de variación del 12.4% dicho valor que fue muy superior a los obtenidos de forma individual para cada toro evaluado, y adujeron que los métodos usados para visualizar en muestras de humanos y otros primates eran infectivos visualizar cuerpos F en espermatozoides de bovinos. Según Chen et al., (1997) indicó que esta técnica era poco confiable para determinar la presencia del cromosoma Y debido a que este puede confundirse con otros elementos coloreados. Björndahl & Barrant,(2003) señalaron que los resultados de la tinción con quinacrina podían ser alterados por la interacción de dicho colorante con la albúmina, generando la observación de falsos cuerpos F; estos investigadores concluyeron que si existiera una variación en la proporción sexual de la progenie, esta no se daría por la capacidad de separación o enriquecimiento de uno u otro tipo de espermatozoides, sino que más bien se da como producto de alguna ventaja funcional de un tipo de espermatozoides frente al otro como resultado de la migración en albúmina; permitiendo así que estas sean capaces de fertilizar los ovocitos.

Existen otros trabajos que determinaron hasta cierto punto la fiabilidad en la coloración con quinacrina para la identificación del cromosoma Y por medio de la observación del cuerpo F, tal es el caso de Beatty (1977) quien efectuó un estudio con espermatozoides, en el cual pudo observar que el 54% de los espermatozoides de las muestras poseía el cuerpo F, existiendo además una desviación estándar de 4.5% entre los donantes, en dicho estudio la estimación lograda con quinacrina no fue exacta al compararlos con una observación directa de ADN específico, sin embargo se determinó que el 83% de los cromosomas Y fueron representados por los cuerpos F antes observados. Por su parte David et al., (1977) efectuaron el trabajo de migración en albumina, donde evaluaron la variación de la

proporción de espermatozoides con cromosoma Y mediante la tinción con quinacrina durante 5 meses, luego del cual concluyeron que la prueba era hasta cierto punto subjetiva, debido que el recuento había variado en este tiempo del 35% al 45%, pero la diferencia entre los observadores se había reducido notablemente durante el mismo periodo, además pudieron mejorar la fiabilidad de la prueba y así mismo se redujo la variabilidad de la misma, realizando los conteos el mismo día por un solo observador.

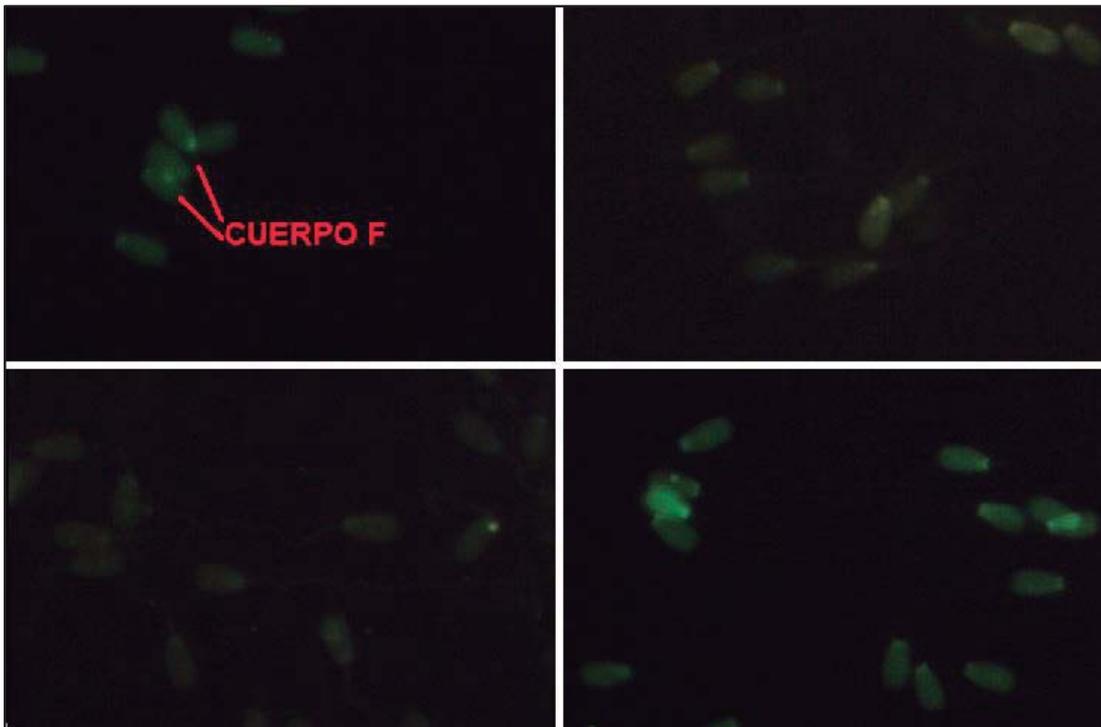
Es posible que la variación observada en la frecuencia inferior de los espermatozoides portadores de cuerpo F menor al 50% luego de las tinciones con quinacrina, que se observó en diversos trabajos de investigación, refleje una verdadera proporción de sexos gaméticos; sin embargo, es más probable que represente una desigual captación del colorante quinacrina por parte de los cromosomas Y; la decoloración del colorante antes del análisis o las variaciones en el material cromosómico, tal como lo señaló Martin (1990). Por su parte Roberts & Goodall (1976) al igual que David et al., (1977) concluyeron que la determinación de los cuerpos F observados en los espermatozoides, está condicionado al criterio y la experiencia del observador al momento de evaluar las muestras, además de la existencia de cierta dependencia en la eficiencia de la detección del cromosoma Y mediante la coloración con quinacrina, la cual está condicionada al tamaño de la cabeza del espermatozoide; así también la variabilidad de los resultados observados puede ser consecuencia de la incapacidad de detectar falsos positivos que se dan por efecto de coloraciones inespecíficas o también falsos negativos que se darían por efecto de alteraciones estructurales de la heterocromatina del cromosoma Y, ello podría ocasionar alguna subjetividad variable al momento de efectuar la observación de las muestras (Guttenbach & Schmid, 1990)

Los factores mencionados anteriormente fueron considerados Bottcher (1996) antes de realizar su estudio y luego de ello concluyó que el uso de la quinacrina le fue válido para determinar la presencia del cromosoma Y en los espermatozoides, lo cual dio validez a los resultados obtenidos por este.

Luego de efectuar el análisis respectivo de esta metodología de evaluación y valorando los criterios de validez en la cuantificación del grado de variación en la proporción de espermatozoides con cromosoma Y obtenidos con el colorante diclorhidrato de quinacrina, se pueden tomar sus resultados como referenciales para determinar el grado de variación

en la proporción de espermatozoides portadores de cromosoma Y en función del cuerpo F observado y con ello se puede concluir que el uso de ASB mediante los tres métodos propuestos, no permitieron obtener una variación significativa en la proporción de espermatozoides con cromosoma Y que lo haga viable como método de sexado, es más se observó que la exposición a ASB ocasionó una reducción en las características espermáticas que fueron evaluadas respecto de las muestras control.

Figura 12. Fotografías de cuerpos F en espermatozoides tras tinción con diclorhidrato de quinacrina



V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó esta investigación y de acuerdo a las metodologías que se expusieron para la ejecución del mismo, se han llegado a las siguientes conclusiones:

1. Respecto a la albúmina sérica bovina como producto utilizado para formar medios densos y bajo las tres metodologías propuestas, no fue posible alterar la proporción de espermatozoides a favor de aquellos que son portadores del cuerpo F.
2. En lo referente a la tasa de recuperación espermática conseguida, se observó que el uso de ASB en el método de doble centrifugación "M1" permitió una mayor recuperación de espermatozoides (50.69%).
3. En cuanto a la alteración en las características espermáticas evaluadas, se observó que la exposición a ASB indistintamente de los métodos propuestos para su utilización, ocasionó deterioro significativo sobre estas, siendo las propuestas de centrifugación más migración "M2" y de doble migración "M3", las que ocasionaron un mayor deterioro, sobre todo en la condición del acrosoma.
4. En lo que respecta al efecto de la congelación sobre las características espermáticas evaluadas, este procedimiento ocasionó un deterioro sobre estas haciéndolas inviábiles para su uso posterior en inseminación artificial.

VI. RECOMENDACIONES

1. El uso del medio de mantenimiento ocasionó un efecto negativo sobre las muestras sometidas a los métodos propuestos para uso de ASB, por tanto sería conveniente mejorar las características del mismo a fin de obtener muestras espermáticas con mejores características que las obtenidas en el presente estudio.
2. Respecto al uso de albúmina sérica bovina, de acuerdo a lo citado por (Björnahl, & Barratt, 2003). Esta pueda ocasionar alteraciones funcionales en los espermatozoides que permitieron a otros autores, alterar la proporción de la progenie, por lo que se recomienda replicar este experimento haciendo uso de pruebas de fertilización *in vitro*; con ello se permitirá conocer la capacidad fecundante de las muestras obtenidas y con los embriones resultantes se podría determinar la proporción del sexo de la progenie mediante pruebas que son consideradas más precisas como puede ser la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia. (FISH).
3. De acuerdo a lo revisado en esta investigación, se pueden utilizar productos como proteínas plasmáticas y donadores de colesterol en las columnas de albúmina, de esta forma se puede evitar el efecto del eflujo de colesterol de la membrana plasmática que pudiera dar por efecto de la migración o centrifugación en dicho medio, con ello es posible que se pudieran obtener muestras capaces de ser sometidas a procedimientos de congelación o al menos pudieran ser capaces de soportar periodos adecuados de conservación en refrigeración.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AISEN, EG; MEDINA, VH; VENTRINO, A. 2002. **Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations.** *Theriogenology* 57: 1801-1808.
2. AITKEN, RJ; CLARKSON, JS. 1988. **Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques.** *J. Androl.* 9(6): 367-376.
3. BEAL, WE; WHITE, LM; GARNER, DL 1984. **Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient.** *Journal of animal science* 58(6):1432-1436.
4. BEATTY, RA. 1977. **F-bodies as Y chromosome markers in mature human sperm heads: a quantitative approach.** *Cytogenet. Cell. Genet.* 18(1): 33-49.
5. BECKETT, TA; MARTIN, RM; HOAR, DI. 1989. **Assessment of the sephadex technique for selection of X-bearing human sperm by analysis of sperm chromosomes, deoxyribonucleic acid and Y-bodies.** *Fertil. Steril.* 52: 829-835
6. BEERNINK, FJ; DMOWSKI, WP; ERICSSON, RJ. 1993. **Sex preselection through albumin separation of sperm.** *Fertil. Steril.* 59(2): 382-386.
7. BJÖRNALHL, L; BARRATT, LR. 2003. **Sex selection, a survey of laboratory methods and clinical results.** Assisted conception unit, Birmingham Hospital & Reproductive biology and genetics group, University of Birmingham. United Kingdom.
8. BLEIL, JD; WASSARMAN, PM. 1983. **Sperm-egginter actions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucid glycoprotein.** *Devl. Biol.* 95: 317-324.

9. BLOTTNER, S; PITRA, C; BERGER, U. 1992. **Y-Chromosome-specific fluorescence (f-body) of poorly decondensed bovine spermatozoa.** *Andrología* 24: 255-259.
10. BLOTTNER, S; BOSTEDT, H; MEWES, K; PITRA, C. 1994. **Enrichment of bovine X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis.** *J. Vet. Med. A.* 41: 466-474.
11. BÖTTCHER, F. 1996. **Pré-seleção sexual *in vitro* comparação entre os métodos de Percoll e Swim up e proposta de nova técnica.** *Tesis Ph.Dr.* Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Brasil.
12. CARDELLINO, R; ROVIRA, J. 1987. **Mejoramiento Genético Animal.** Edit. Agrop. Hemisferio Sur. Uruguay. 253 p.
13. CHEN, M; GUU, H; HO, ES. 1997. **Efficiency of sex pre-selection of spermatozoa by albumin separation method evaluated by double-labelled fluorescence in-situ hybridization.** *Human Reproduction* 12(9): 1920-1926.
14. COSTA, A. 2007. **Influência do método de separação dos espermatozoides viáveis (“Swim up”) na eficiência de seleção do sexo de bovinos por gradiente descontínuo de densidade e o impacto no melhoramento genético animal.** *Tesis Mgt.* Universidade Estadual Paulista. São Paulo. Brasil.
15. CÓRDOVA, IA; RUIZ, LC; CÓRDOVA, JC; CÓRDOVA, JM; GUERRA, LJ; RODRÍGUEZ, B; ARANCIBIA, K. 2009. **Estrés Oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática.** *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 3(1): 01-38.
16. CORSON, SL; BATSER, FR; ALEXANDER, NJ; SCHLAFF, S; OTIS, C. 1984. **Sex selection by sperm separation and insemination.** *Fertility and Sterility* 42(5): 756-760.

17. CORREA, JR; ZAVOS PM. 1994. **The Hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of frozen-thawed bovine sperm membrane.** *Theriogenology* 42 (2): 351-360.
18. CORREA, RJ; PANAYOTA, N; ZARMAKOUPIIS-ZAVOS, N; ZAVOS, PM. 1997. **Quantitative and qualitative characteristics of frozen-thawed bovine spermatozoa recovered via a conventional a standardized swim-up technique.** *Tohoku J. Exp. Med.* 181: 267-274.
19. CRAN, DG; COCHRANE, DJ; JOHNSON, L; WEI, H; LU, HK; POLGE, C. 1994. **Separation of X- and Y- chromosome bearing bovine sperm by flow cytometry for use on IVF.** *Theriogenology* 41: 183.
20. CROZET, N; DUMONT, M. 1984. **The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte.** *Gametes Res.* 10: 97-105.
21. ČERVENKA, J; JACOBSON, DE; GORLIN, RJ. 1971. **Fluorescing Structures of Human Metaphase Chromosomes. Detection of “Y Body”.** *American Society of Human Genetics* p: 317-324.
22. DAVID, G; JEULIN, C; BOYCE, A; SCHWARTZ, D. 1977. **Motility and percentage of Y- and YY-bearing spermatozoa in human semen samples after passage through bovine serum albumin.** *J. Reprod. Fert.* 50:377-379.
23. DREVIUS, LO; ERIKSSON, H. 1966. **Osmotic swelling of mammalian spermatozoa.** *Expl. Cell. Res.* 42: 136-156.
24. ERICSSON, JR; LANGEVIN, CN; NISHINO, M. 1973. **Isolation of fractions rich in human Y sperm.** *Nature* 246: 421-424.
25. EVENSON, DP; LARSON, KL; JOST, LK. 2002. **Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.** *J. Androl.* 23: 25-43.

26. FLAHERTY, SP; MICHALOWSKA, J; SWANN, NJ; DMOWSKI, WP; MATTHEWS CD; AITKEN RJ. 1997. **Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa.** *Human Reproduction* 12 (5): 938-942.
27. FRASER, LR; McDERMOTT, CA. 1992. **Ca(2+)-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca(2+)-ATPase.** *J. Reprod. Fertil.* 9: 363-77.
28. GARNER, DL. 2006. **Flow cytometric sexing on mammalian sperm.** *Theriogenology* 65: 943-957.
29. GUTTENBACH, M; SCHMID, M. 1990. **Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization.** *Am. J. Hum. Genet.* 46: 553-558.
30. HADI, S; AL-TIMIMI, IH. 2013. **Separation of Y-chromosome Bearing Ram's Sperms using an Albumin Gradient Technique and Identification of Embryos by PCR.** *AL-Qadisiya Journal of Vet. Med. Sci.* 12(1): 144-151.
31. HERNANDEZ, SR; FERNANDEZ, CC; BAPTISTA, LP. 2010. **Metodología de la investigación.** México. Edit. Mc Graw Hill- Quinta Edición en español.
32. HERNÁNDEZ, P; FERNÁNDEZ, R; REYES, C; CEREZO, P; ECHEGARAY, L; MENDOZA, B. 2008. **Separación de espermatozoides "Y" de eyaculado de conejo por medio de gradientes de densidad de albúmina sérica humana.** *Rev. Salud Anim.* 30: 45-49.
33. HOSSEPIAN DE LIMA, VFM. 1998. **Seleção do sexo em espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade.** *Tesis Ph. Dr.* Instituto de Biociências – Universidade São Paulo. Brasil.
34. ISHIJIMA, SA; OKUNO, M; MOHRI, H. 1991. **Zeta potential of human X- and Y- bearing sperm.** *Int. J. Androl.* 14: 340-347.

35. JEYENDRAN, R; VAN DER VEN, H; PÉREZ-PELÁEZ, M; GRABO, B; ZANEVELD, L. 1984. **Development of an essay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.** J. Reprod. Fertil. 70: 219-228.
36. JOHNSON, LA; WELCH, GR. 1999. **Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency.** Theriogenology 52 (8): 303-326.
37. KANEKO. S; YAMAGUCHI; KOBAYASHI, T; LIZUKA, R. 1983. **Separation of X- and Y- bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation.** Fert. Steril. 40: 661–665.
38. KANEKO. S; OSHIO, S; KOBAYASHI, T; LIZUKA, R; MOHRI, H. 1984. **Human X- and Y- bearing sperm differ in cell surface sialic acid content.** Bioch. Bioph. Res. Com. 124: 950-955.
39. KOPF, GS; GERTON, GL. 1991. **The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction.** Edit. Wassarman P.M. Elements of Mammalian Fertilization. CRC. Press. 1: 153-203.
40. KORN, GA; GAULDEN, ME; BAXTER, CR; HERNDON, JH. 1978. **Use of the Y-body for identification of skin source on a successfully grafted burn patient.** The journal of investigative dermatology 70: 285-287.
41. KOVÁCS, A; FOOTE, RH. 1992. **Viability and Acrosome Staining of Bull, Boar and Rabbit Spermatozoa.** Biotechnic & Histochemistry 67 (3): 119-124.
42. KÚTVÖLGYI, G; STEFLER, J; KOVÁCS, A. 2006. **Viability and acrosome staining of Stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa.** Biotechnic & Histochemistry 81(4-6): 109-117.

43. LIBBUS, BL; PERREAULT, SD; JOHNSON, L; PINKEL, D. 1987. **Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with HOESCHT 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting.** Mutat. Res. 182: 265-274.
44. LU, Y; ZHANG, M; LU, S; XU, D; HUANG, W; MENG, B; XU, H; LU, K. 2010. **Sex-preselected buffalo (*Bubalus bubalis*) calves derived from artificial insemination with sexed sperm.** Animal Reproduction Science 119: 169-171.
45. MAKKAR, G; NG, HY; YEUNG, SB; HO, PC. 1999. **Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium.** Fertil Steril. 72: 796-802.
46. MARTIN, RH. 1990. **Sex ratio among sperm cells.** Am. J. Hum. Genet. 47: 349-351.
47. MOTA, AV; OBA, E; CASTRO, A; ARAUJO, M; STELLA, E; RAMOS, A. 2007. **Selection of X chromosome of buffaloes sperm with Percoll gradients.** Ital. J. Anim. Sci. 6: 807-809.
48. NOLAN, JP; GRAHAM, JK; HAMMER-STEDT, RH. 1992. **Artificial induction of exocytosis in bull sperm.** Arch. Biochem. Biophys. 292: 311-322.
49. OLIVEIRA, LZ; ARRUDA, RP; CELEGHINI, ECC; ANDRADE, AFC; PERINI, AP; RESENDE, MV; MIGUEL, MCV; LUCIO AC; HOSSEPIAN DE LIMA, VFM. 2011a. **Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association.** Andrología 44: 9-15.
50. OLIVEIRA, LZ; ARRUDA, RP; CELEGHINI, ECC; ANDRADE, AFC; HOSSEPIAN DE LIMA, VFM. 2011b. **Taxa de recuperação e características espermáticas após a sexagem por centrifugação em gradiente de densidade em espermatozoides descongelados.** Rev. Bras. Reprod. Anim. 35(1): 41-48

51. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD “OMS”, 1992. **Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical.** Editorial Panamericana. Colombia. 1992.
52. PALMA, G. 2008. **Biotecnología de la Reproducción.** Edit. REPROBIOTEC. Argentina. Segunda edición. 669 p.
53. PALMA, G. 2001. **Biotecnología de la reproducción.** Ediciones INTA. Argentina. Primera edición. 704 p.
54. PALOMO, MJ. 1995. **Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación *in vitro* en el caprino.** Tesis Dr. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
55. PARKS, JE; AORIN, JW; FOOTE, RH. 1987. **Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane for bovine spermatozoa.** Biol. Reprod. 37: 1249-1258.
56. PEARSON, PL; BOBROW, M. 1970. **Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei.** Nature 226: 78-80.
57. PEREZ-PE, R; MARTI, JL; OSADA, J; MUIÑO-BLANCO, T; CEBRIAN-PEREZ, JA. 1998. **Reversión de los daños producidos por frío sobre la membrana de espermatozoides ovinos. Estudio mediante CCCD y ensayos de viabilidad celular.** Producción Ovina y Caprina. 23:501-505.
58. RESENDE, MV; BARBOSA, BM; PERECIN, F; OLIVEIRA, AA; COSTA, A; HOSSEPINA DE LIMA, VFM. 2009. **Separation of x-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll® and Optiprep® density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production.** Ciência Animal Brasileira 10(2): 581-587.
59. REVELL, SG; MRODE, RA. 1994. **An osmotic resistance test for bovine semen.** Animal Reproduction Science 36 (1-2): 77-86.

60. ROBERTS, AM; GOODALL, H. 1976. **Y chromosome visibility in quinacrina-stained spermatozoa.** Nature 262: 493-494.
61. ROSE, GA; WONG, A. 1998. **Experiences in Hong Kong with theory and practice of the albumin column method of sperm separation for sex selection.** Human Reproduction 13 (1): 146-149.
62. RUBIO-GUILLÉN, J; GONZÁLES, D; GONZÁLES, Y; MADRID-BURY, N; QUINTERO-MORENO, A. 2007. **¿Puede el ORT complementar las pruebas clásicas de valoración seminal y predecir la fertilidad en toros?.** APPA – ALPA. Cusco. Perú.
63. SALKIND, N. 1998. **Métodos de investigación.** México. Edit. PRENTICE HALL.
64. SAMARDZIJA, M; KARADJOLE, M; GETZ, I; MAKEK, Z; CERGOLJ, M; DOBRANIC, T. 2006. **Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro.** Reproductive Biology and Endocrinology 4: 58.
65. SCHILLING, E. 1966. **Experiments in sedimentation and centrifugation of bull spermatozoa and the sex ratio of born calves.** J. Reprod. Fert. 11: 469–472.
66. SQUIRES, E; KEITH, S; GRAHAM, J. 2004. **Evaluation for protective cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa.** Theriogenology 62: 1056-1065.
67. TALBOT, P; CHACON, R. 1981. **A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm.** J. Exp. Zool. 215: 201-208.
68. TATES, AD; PEARSON, PL; GERAEDTS, JPM. 1975. **Identification of X and Y spermatozoa in the Northern Vole, *Microtus Oeconomus*.** J. Reprod. Fert. 42: 195-198.
69. UEDA, K.; YANAGIMACHI, R. 1987. **Sperm chromosome analysis as a new system to test human X- and Y-sperm separation.** Gamete Res. 17: 221–228.

70. VAN VLECK, LD; POLLAK, JE; BRANDFORD-OLTENACU, EA. 1987. **Genetics for the animal Science**. New York. W.H. Freeman, cap. 13. p. 287-313.
71. VAN VLECK, LD; EVERETT, RW. 1976. **Genetic value of sexed semen to procedure dairy Heifers**. Journal of Dairy Science 59: 1802-1807.
72. VILORIA, STA. 2008. **Efecto del tabaco sobre la calidad seminal: Estudio citogenético y molecular del ADN**. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina y Odolontología – Dep. Pediatría, obstetricia y ginecología. Universidad de Valencia. España.
73. WATKINS, AM; CHAN. PJ; KALUGDAN, TH. 1996. **Analysis of the flow cytometer stain Hoechst 33342 on human spermatozoa**. Mol. Hum. Reprod. 2: 709-712.
74. WATSON, PF. 2000. **The causes of reduced fertility with criopreserved semen**. Animal Reproduction Science 60: 481-492.
75. ZARUTSKIE, PV; MULLER, CH; MAGONE, M; SOULES, MR. 1989. **The clinical relevance of sex selection techniques**. Fertil. Steril. 52: 891-905.
76. ZAVOS, PM. 1985. **Sperm separation attempts via the use of albumin gradients in rabbits**. Theriogenology 23(6): 875-879.
77. ZUBKOVA, EV; ROBAIRE, B. 2006. **Effects of ageing on spermatozoa chromatin and its sensitivity to *in vivo* and *in vitro* oxidative challenge in the Brown Norway rat**. Human Reproduction 21(11): 2901–2910.

ANEXOS

ANEXO 1

MEDIOS Y MATERIALES UTILIZADOS

Medio mantenimiento y de lavado espermático MM	
Producto	Cantidad
TRIS	225.0 mM
Fructosa	20.9 mM
Ácido cítrico	78.0 mM
Agua bidestilada	-----
1. Se mezclan con la ayuda de una bagueta. 2. Se evalúa el pH y debe ser 7.0. 3. El producto final se almacena en refrigeración hasta su uso que no debe exceder más de 7 días.	

Solución madre de ASB (solución stock)	
Producto	Cantidad
Medio de mantenimiento (MM)	88 Ml
Albúmina sérica bovina (liofilizada)	12 gr
1. Mezclar con la ayuda de una bagueta. 2. Centrifugar durante 8 minutos a 3,000X 3. Recuperar el sobrenadante y llevarlo a congelación a -20°C hasta su uso.	

ANEXO 1

MEDIOS Y MATERIALES UTILIZADOS

Gradiente de ASB al 50% de solución stock	
Producto	Cantidad
Solución madre de ASB	30 mL
Medio de mantenimiento	30 mL
1. Atemperar ambos productos a 25°C 2. Mezclar sin agitar para evitar que se incorpore aire al interior del medio. 3. Utilizar al momento.	

PRODUCTOS UTILIZADOS

Nro.	Producto	Marca	Lote
1	Albumina sérica bovina liofilizada	BIOPACK	
2	Diclorhidrato de Quinacrina	SIGMA	
3	Ácido cítrico monohidratado	Fco 25gr	
4	Disodio hidrogeno fosfato	Fco 25gr	
5	Ácido acético glacial	BIOPACK	
6	Metanol al 100%		
7	Etanol al 100%		
8	Azul tripan	BIOPACK	
9	Solución Giemsa	Merk	

ANEXO 2

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA

ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS EN MILLONES
The ANOVA Procedure

Class Level Information
Class Levels Values
METODO 4 1 2 3 4
BLOQUE 3 1 2 3
Number of observations 60

ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS EN MILLONES
The ANOVA Procedure
Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	2.1710136E17	1.9736488E16	21.41	<.0001
Error	48	4.4252725E16	9.2193177E14		
Corrected Total	59	2.6135409E17			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.830679	28.99339	30363329	104725000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	2.1142832E17	7.0476107E16	76.44	<.0001
BLOQUE	2	3.0049188E15	1.5024594E15	1.63	0.2066
METODO*BLO	6	2.6681229E15	4.4468715E14	0.48	0.8182

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	2.1142832E17	7.0476107E16	158.48	<.0001
BLOQUE	2	3.0049188E15	1.5024594E15	3.38	0.1040

ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS EN MILLONES
The ANOVA Procedure
Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	4.447E14

Number of Means	2	3	4
Critical Range	18841485	19527464	19867765

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	201250000	15	1
B	101600000	15	2
C	72283333	15	3
D	43766667	15	4

ANEXO 3

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE VITALIDAD ESPERMÁTICA

MUESTRAS FRESCAS.

VIVOS GIEMSA FRESCO ACOS

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
METODO	4	1 2 3 4
BLOQUE	3	1 2 3

Number of observations 60

VIVOS GIEMSA FRESCO ACOS

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	1.54846348	0.14076941	9.98	<.0001
Error	48	0.67695486	0.01410323		
Corrected Total	59	2.22541834			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.695808	10.61529	0.118757	1.118735

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	1.49375944	0.49791981	35.31	<.0001
BLOQUE	2	0.00077429	0.00038715	0.03	0.9729
METODO*BLOQUE	6	0.05392974	0.00898829	0.64	0.6997

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	1.49375944	0.49791981	55.40	<.0001
BLOQUE	2	0.00077429	0.00038715	0.04	0.9581

The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experiment wise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.008988

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.08471	.08779	.08932

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.29338	15	4
B	1.18665	15	3
B	1.12985	15	2
C	0.86507	15	1

ANEXO 3

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE VITALIDAD ESPERMÁTICA

MUESTRAS REFRIGERADAS.

VIVOS GIEMSA REFRIGERADO ACOS

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
METODO	4	1 2 3 4
BLOQUE	3	1 2 3
Number of observations 60		

VIVOS GIEMSA REFRIGERADO ACOS

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.93245808	0.08476892	5.37	<.0001
Error	48	0.75728634	0.01577680		
Corrected Total	59	1.68974442			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.551834	10.85340	0.125606	1.157293

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.88657354	0.29552451	18.73	<.0001
BLOQUE	2	0.01493868	0.00746934	0.47	0.6257
METODO*BLOQUE	6	0.03094586	0.00515764	0.33	0.9196

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.88657354	0.29552451	57.30	<.0001
BLOQUE	2	0.01493868	0.00746934	1.45	0.3068

VIVOS GIEMSA REFRIGERADO ACOS

The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.005158

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.06417	.06650	.06766
Means with the same letter are not significantly different.			

g	Mean	N	METODO
A	1.26584	15	4
A	1.26051	15	3
B	1.13581	15	2
C	0.96701	15	1

ANEXO 3

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE VITALIDAD ESPERMÁTICA

MUESTRAS CONGELADAS.

VIVOS CONGELADOS ACOS

The ANOVA Procedure
 Class Level Information
 Class Levels Values
 METODO 4 1 2 3 4
 BLOQUE 3 1 2 3
 Number of observations 60

VIVOS CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure
 Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.99084868	0.09007715	8.43	<.0001
Error	48	0.51263979	0.01068000		
Corrected Total	59	1.50348847			

R-Square Coeff Var Root MSE VALOR Mean
 0.659033 8.103987 0.103344 1.275225

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.94622580	0.31540860	29.53	<.0001
BLOQUE	2	0.01296850	0.00648425	0.61	0.5490
METODO*BLOQUE	6	0.03165438	0.00527573	0.49	0.8096

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.94622580	0.31540860	59.78	<.0001
BLOQUE	2	0.01296850	0.00648425	1.23	0.3570

VIVOS CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure
 Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom: 6
 Error Mean Square: 0.005276
 Number of Means 2 3 4
 Critical Range .06490 .06726 .06843

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.37243	15	4
A	1.35823	15	3
A	1.30861	15	2
B	1.06162	15	1

ANEXO 4

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA

MUESTRAS FRESCAS.

motilidad fresco ACOS
The ANOVA Procedure

Class Level Information
Class Levels Values
METODO 4 1 2 3 4
BLOQUE 3 1 2 3
Number of observations 60

motilidad fresco ACOS
The ANOVA Procedure
Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	5.12804957	0.46618632	34.86	<.0001
Error	48	0.64186371	0.01337216		
Corrected Total	59	5.76991328			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.888757	10.94009	0.115638	1.057012

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	5.06597909	1.68865970	126.28	<.0001
BLOQUE	2	0.00181952	0.00090976	0.07	0.9343
METODO*BLOQUE	6	0.06025096	0.01004183	0.75	0.6117

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	5.06597909	1.68865970	168.16	<.0001
BLOQUE	2	0.00181952	0.00090976	0.09	0.9146

motilidad fresco ACOS
The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.010042

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.08954	.09280	.09441

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.33571	15	4
B	1.24445	15	3
C	1.06508	15	2
D	0.58281	15	1

ANEXO 4

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA

MUESTRAS REFRIGERADAS.

MOT REFRIG ACOS

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
METODO	4	1 2 3 4
BLOQUE	3	1 2 3

Number of observations 60

MOT REFRIG ACOS

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	1.63267536	0.14842503	8.54	<.0001
Error	48	0.83470294	0.01738964		
Corrected Total	59	2.46737830			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.661705	12.34667	0.131870	1.068060

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	1.59739276	0.53246425	30.62	<.0001
BLOQUE	2	0.01174232	0.00587116	0.34	0.7151
METODO*BLOQUE	6	0.02354028	0.00392338	0.23	0.9665

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	1.59739276	0.53246425	135.72	<.0001
BLOQUE	2	0.01174232	0.00587116	1.50	0.2970

MOT REFRIG ACOS

The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.003923

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.05597	.05800	.05901

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.26490	15	4
B	1.13331	15	3
C	1.05773	15	2
D	0.81630	15	1

ANEXO 4

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA

MUESTRAS CONGELADAS.

MOTIL CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
METODO	4	1 2 3 4
BLOQUE	3	1 2 3
Number of observations 60		

MOTIL CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	2.66131958	0.24193814	23.19	<.0001
Error	48	0.50081332	0.01043361		
Corrected Total	59	3.16213290			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.841622	7.776594	0.102145	1.313493

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	2.60674834	0.86891611	83.28	<.0001
BLOQUE	2	0.01361416	0.00680708	0.65	0.5253
METODO*BLOQUE	6	0.04095708	0.00682618	0.65	0.6865

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	2.60674834	0.86891611	127.29	<.0001
BLOQUE	2	0.01361416	0.00680708	1.00	0.4228

The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha: 0.05

Error Degrees of Freedom: 6

Error Mean Square: 0.006826

Number of Means 2 3 4

Critical Range .07382 .07651 .07784

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.52522	15	4
A	1.46688	15	3
B	1.27017	15	2
C	0.99170	15	1

ANEXO 5

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA (REACCIÓN POSITIVA)

MUESTRAS FRESCAS.

HOST+ FRESCO ACOS
The ANOVA Procedure
Class Level Information
Class Levels Values
METODO 4 1 2 3 4
BLOQUE 3 1 2 3
Number of observations 60

HOST+ FRESCO ACOS
The ANOVA Procedure
Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.93402822	0.08491166	5.40	<.0001
Error	48	0.75546641	0.01573888		
Corrected Total	59	1.68949463			

R-Square Coeff Var Root MSE VALOR Mean
0.552845 11.73187 0.125455 1.069350

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.86969943	0.28989981	18.42	<.0001
BLOQUE	2	0.04090298	0.02045149	1.30	0.2821
METODO*BLOQUE	6	0.02342581	0.00390430	0.25	0.9578

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.86969943	0.28989981	74.25	<.0001
BLOQUE	2	0.04090298	0.02045149	5.24	0.0483

HOST+ FRESCO ACOS
The ANOVA Procedure
Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 6
Error Mean Square 0.003904

Number of Means 2 3 4
Critical Range .05583 .05786 .05887

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.16093	15	4
A	1.12760	15	3
A	1.12668	15	2
B	0.86219	15	1

ANEXO 5

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA (REACCIÓN POSITIVA)

MUESTRAS REFRIGERADAS.

HOST REFRIG ACOS
The ANOVA Procedure
Class Level Information
Class Levels Values
METODO 4 1 2 3 4
BLOQUE 3 1 2 3

Number of observations 60
HOST REFRIG ACOS

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.71789472	0.06526316	9.04	<.0001
Error	48	0.34644124	0.00721753		
Corrected Total	59	1.06433595			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.674500	7.830120	0.084956	1.084990

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.61730275	0.20576758	28.51	<.0001
BLOQUE	2	0.07133267	0.03566634	4.94	0.0112
METODO*BLOQUE	6	0.02925930	0.00487655	0.68	0.6698

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.61730275	0.20576758	42.20	0.0002
BLOQUE	2	0.07133267	0.03566634	7.31	0.0246

HOST REFRIG ACOS
The ANOVA Procedure
Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 6
Error Mean Square 0.004877

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.06239	.06467	.06579

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan
Grouping

Mean	N	METODO
A	15	4
B A	15	3
B	15	2
C	15	1

ANEXO 5

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA (REACCIÓN POSITIVA)

MUESTRAS CONGELADAS.

HOST CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
METODO	4	1 2 3 4
BLOQUE	3	1 2 3
Number of observations	60	

HOST CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.11907135	0.01082467	0.98	0.4746
Error	48	0.52854517	0.01101136		
Corrected Total	59	0.64761652			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.183861	9.195792	0.104935	1.141120

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.05998954	0.01999651	1.82	0.1568
BLOQUE	2	0.04488051	0.02244026	2.04	0.1414
METODO*BLOQUE	6	0.01420130	0.00236688	0.21	0.9703

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.05998954	0.01999651	8.45	0.0142
BLOQUE	2	0.04488051	0.02244026	9.48	0.0139

Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha: 0.05

Error Degrees of Freedom: 6

Error Mean Square: 0.002367

Number of Means 2 3 4

Critical Range .04347 .04505 .04584

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.16688	15	4
A	1.16669	15	3
A	1.14158	15	2
B	1.08933	15	1

ANEXO 6

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE INTEGRIDAD DE ACROSOMA

MUESTRAS FRESCAS.

VAI REFRIG ACOS
 The ANOVA Procedure
 Class Level Information
 Class Levels Values
 METODO 4 1 2 3 4
 BLOQUE 3 1 2 3
 Number of observations 60

VAIFRESCOACOS
 The ANOVA Procedure
 Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	1.49526149	0.13593286	9.04	<.0001
Error	48	0.72164405	0.01503425		
Corrected Total	59	2.21690554			

R-Square Coeff Var Root MSE VALOR Mean
 0.674481 10.26061 0.122614 1.195000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	1.44251282	0.48083761	31.98	<.0001
BLOQUE	2	0.00448835	0.00224417	0.15	0.8617
METODO*BLOQUE	6	0.04826032	0.00804339	0.54	0.7789

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	1.44251282	0.48083761	59.78	<.0001
BLOQUE	2	0.00448835	0.00224417	0.28	0.7658

VAIFRESCOACOS
 The ANOVA Procedure
 Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 6
 Error Mean Square 0.008043

Number of Means 2 3 4
 Critical Range .08013 .08305 .08450

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.36347	15	4
B	1.26229	15	3
B	1.21029	15	2
C	0.94395	15	1

ANEXO 6

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE INTEGRIDAD DE ACROSOMA

MUESTRAS REFRIGERADAS.

VAI REFRIG ACOS
The ANOVA Procedure

Class Level Information
Class Levels Values
METODO 4 1 2 3 4
BLOQUE 3 1 2 3
Number of observations 60

VAI REFRIG ACOS

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	1.10258125	0.10023466	7.25	<.0001
Error	48	0.66318874	0.01381643		
Corrected Total	59	1.76576999			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.624420	9.626702	0.117543	1.221013

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	1.04871717	0.34957239	25.30	<.0001
BLOQUE	2	0.01588102	0.00794051	0.57	0.5667
METODO*BLOQUE	6	0.03798307	0.00633051	0.46	0.8356

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	1.04871717	0.34957239	55.22	<.0001
BLOQUE	2	0.01588102	0.00794051	1.25	0.3506

VAI REFRIG ACOS
The ANOVA Procedure
Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.006331

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.07109	.07368	.07496

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.33648	15	3
A	1.33284	15	4
B	1.20288	15	2
C	1.01185	15	1

ANEXO 6

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE INTEGRIDAD DE ACROSOMA

MUETRAS CONGELADAS.

VAI CONGELADO ACOS
The ANOVA Procedure

Class Level Information
Class Levels Values
METODO 4 1 2 3 4
BLOQUE 3 1 2 3
Number of observations 60

VAI CONGELADO ACOS
The ANOVA Procedure
Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.54527900	0.04957082	6.35	<.0001
Error	48	0.37449275	0.00780193		
Corrected Total	59	0.91977175			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.592842	6.297689	0.088329	1.402555

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.51027664	0.17009221	21.80	<.0001
BLOQUE	2	0.00299592	0.00149796	0.19	0.8259
METODO*BLOQUE	6	0.03200643	0.00533441	0.68	0.6635

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.51027664	0.17009221	31.89	0.0004
BLOQUE	2	0.00299592	0.00149796	0.28	0.7646

VAI CONGELADO ACOS
The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.005334

Number of Means	2	3	4
Critical Range	.06526	.06763	.06881

Means with the same letter are not significantly different.

ng	Mean	N	METODO
A	1.49197	15	4
B A	1.46044	15	3
B	1.40580	15	2
C	1.25201	15	1

ANEXO 7

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE CUERPO F

CUERPO F CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
METODO	4	1 2 3 4
BLOQUE	3	1 2 3
Number of observations 48		

CUERPO F CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: VALOR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	0.03195458	0.00290496	0.70	0.7277
Error	36	0.14885200	0.00413478		
Corrected Total	47	0.18080658			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALOR Mean
0.176733	5.944245	0.064302	1.081756

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.00635213	0.00211738	0.51	0.6765
BLOQUE	2	0.00665306	0.00332653	0.80	0.4552
METODO*BLOQUE	6	0.01894938	0.00315823	0.76	0.6031

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for METODO*BLOQUE as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	3	0.00635213	0.00211738	0.67	0.6006
BLOQUE	2	0.00665306	0.00332653	1.05	0.4055

CUERPO F CONGELADO ACOS

The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for VALOR

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.003158

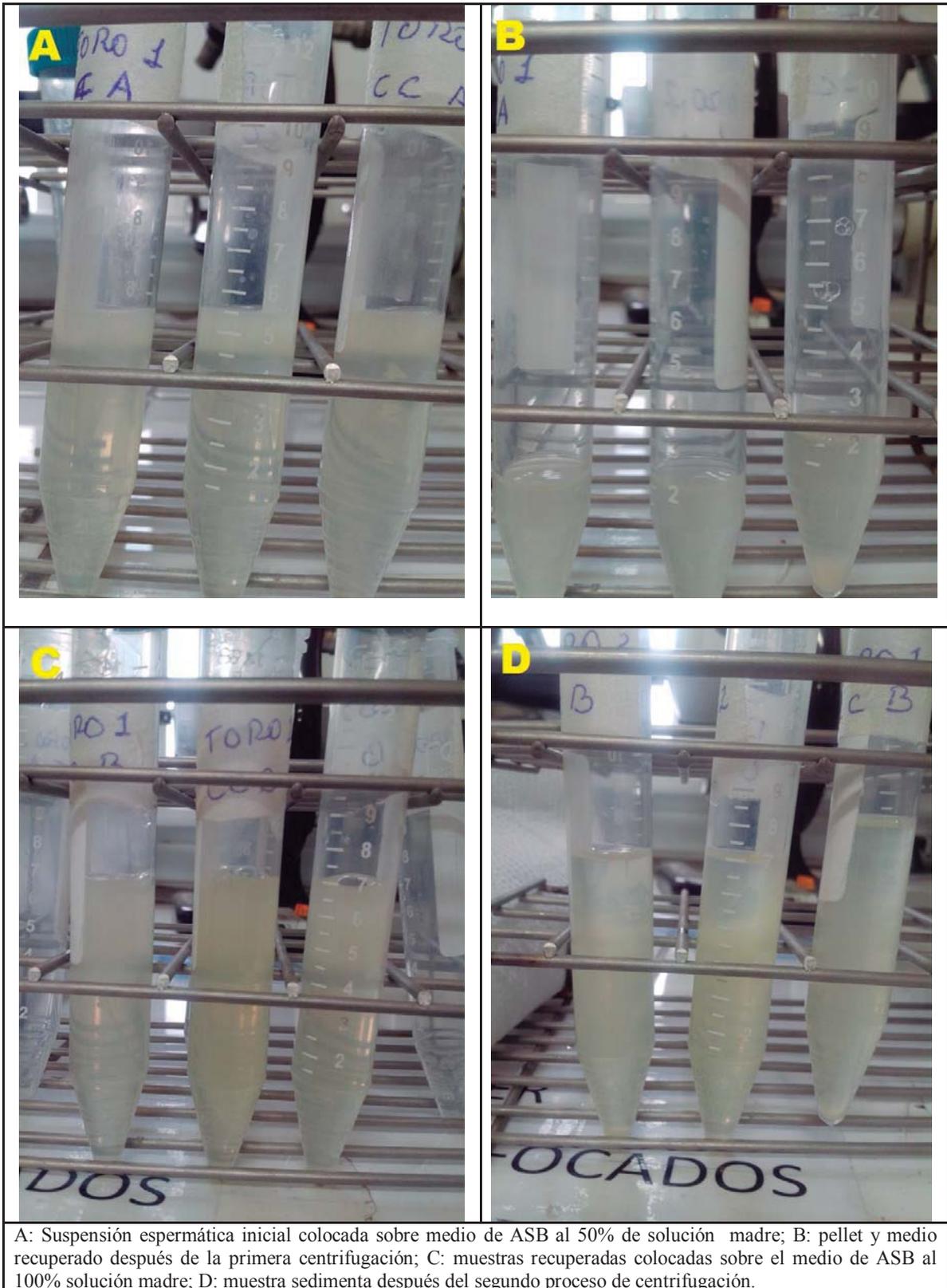
Number of Means	2	3	4
Critical Range	.05614	.05818	.05920

Means with the same letter are not significantly different.

g	Mean	N	METODO
A	1.09391	12	3
A	1.09006	12	2
A	1.07873	12	4
A	1.06433	12	1

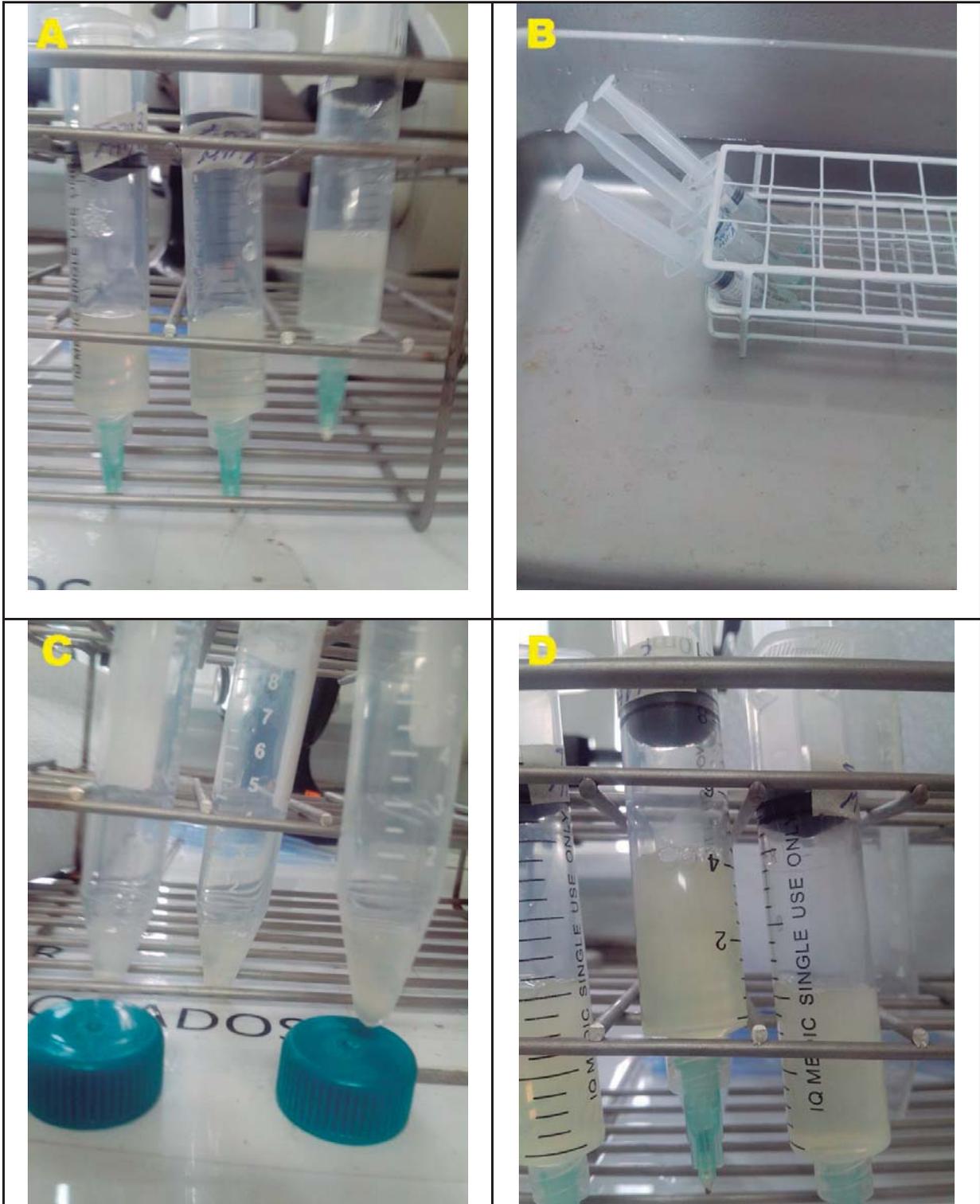
ANEXO 8

FOTOGRAFÍAS PROCESO DE DOBLE CENTRIFUGACIÓN EN ASB



ANEXO 9

FOTOGRAFÍAS PROCESO DE DOBLE CENTRIFUGACIÓN EN ASB



A: colocación de la suspensión espermática sobre la primera columna de ASB antes del primer proceso de migración, B: Proceso de migración en baño maría a 36°C; C: fracción recuperada para realizar el segundo proceso de migración. D: material preparado para realizar el segundo proceso de migración.

ANEXO 10
OTRAS FOTOGRAFÍAS





Muestra en la gradiente de ASB
previa a ser centrifugada



Muestra en la gradiente de ASB
después de ser centrifugada



Tratamiento de centrifugación más
migración, (post-centrifugación)



Parte correspondiente a la migración de T1 y T2
en jeringas acondicionadas para ser colocadas
en la gradilla y ser incubadas en baño maria

ANEXO 11
CUADROS GENERALES DE DATOS Y RESULTADOS PARA EL ANÁLISIS
ESTADÍSTICO

RECOPILACION GENERAL DE DATOS PARA LA TESIS POST APLICACION DE MÉTODO - "MUESTRAS FRESCAS"

METODO	CODIGO	concentracion		matrididad OMS		reaccion HOS		AZUL TRIPAN ECOSINA			TINCION GEMSA			TRIPLE TINCION GEMSA						% triple tincion						
		conteo	millones/ml	%RECUP	1 obs	2 obs	3 obs	%	SPZ	RV+	RVX	%RX+	SPZ	AI	AD	%AI	SPZ	VAI	VAD	MAI	MAD	%VAD	%VAI	%VAD	%MAI	%MAD
		ml	ml	ml					V	M			AI	AD	%AI	VAI	VAD	MAI	MAD	%VAD	%VAI	%VAD	%MAI	%MAD		
CTRL	TOROA	368.0	514.242857.1	17900000.0	1.000	0.80	0.85	0.8167	1.000	245	164	91	0.6694	1.000	230	227	3	230	0.6609	0.9877	0.6609	0.0000	0.3261	0.0130		
M+M	TOROA	162.5	23244285.7	81750000.0	0.454	0.40	0.35	0.3657	0.4684	282	136	151	0.4728	0.7078	175	152	119	228	0.3728	0.8662	0.4921	0.0307	0.5409	0.0833		
C+M	TOROA	153.5	19282857.1	76750000.0	0.429	0.25	0.25	0.2500	0.3051	344	138	206	0.4013	0.5933	222	593	20	222	0.2658	0.8648	0.2552	0.0405	0.6396	0.0946		
C+C	TOROA	117.0	16714285.7	58500000.0	0.437	0.10	0.05	0.1510	0.1724	355	70	257	0.2555	0.5678	64	2	145	230	0.3000	0.9500	0.2509	0.0091	0.6596	0.0409		
M+M	TOROB	368.0	52574286.4	184000000.0	1.000	0.90	0.90	0.8833	1.0000	314	191	123	0.6083	1.0000	296	208	188	242	0.6405	0.9256	0.6198	0.0207	0.3508	0.0737		
M+M	TOROB	160.5	23942857.1	80250000.0	0.436	0.35	0.30	0.3010	0.3585	299	155	144	0.4400	0.8522	285	137	148	177	0.3944	0.8545	0.3286	0.0657	0.5068	0.0798		
C+M	TOROB	147.0	21000000.0	73500000.0	0.399	0.30	0.30	0.3000	0.3396	318	172	146	0.4400	0.8892	333	141	192	180	0.2500	0.8722	0.2278	0.0222	0.6444	0.1056		
C+C	TOROB	107.0	15285714.3	53500000.0	0.291	0.10	0.05	0.1500	0.2465	228	109	119	0.4781	0.7859	324	120	204	0.3704	0.5271	0.1877	0.0358	0.7051	0.0892			
CTRL	TOROC	309.0	54242857.1	154500000.0	1.000	0.85	0.85	0.8500	1.0000	281	190	91	0.6762	1.0000	164	91	259	0.7972	0.8887	0.5405	0.0386	0.3495	0.0734			
M+M	TOROC	167.5	23244285.7	83750000.0	0.542	0.40	0.35	0.3510	0.4314	255	132	132	0.4824	0.7134	130	129	239	0.4816	0.9218	0.4245	0.0286	0.4042	0.0988			
C+M	TOROC	78.5	11924285.7	39250000.0	0.254	0.25	0.20	0.2000	0.2833	333	289	167	0.3728	0.8546	84	17	42	240	0.4208	0.7542	0.3500	0.0708	0.4492	0.1750		
C+C	TOROC	41.5	5928571.4	20750000.0	0.134	0.15	0.15	0.1500	0.1667	122	38	84	0.3115	0.4607	4	68	72	214	0.1963	0.8164	0.1589	0.0374	0.6776	0.1262		
CTRL	TOROA	260.5	37214285.7	130250000.0	1.000	0.90	0.95	0.9019	1.0000	260	169	91	0.6500	1.0000	263	233	30	263	0.5399	0.8851	0.5133	0.0266	0.3726	0.0875		
M+M	TOROA	158.5	22642857.1	79250000.0	0.608	0.35	0.40	0.4500	0.4964	264	140	124	0.5303	0.8158	254	213	41	254	0.4213	0.8338	0.3780	0.0433	0.4606	0.1181		
C+M	TOROA	91.5	13071428.6	46750000.0	0.351	0.30	0.30	0.2510	0.2833	309	297	166	0.3115	0.5589	103	143	118	212	0.2463	0.5283	0.3984	0.0469	0.4259	0.1250		
C+C	TOROA	27.0	3857142.9	13500000.0	0.104	0.15	0.20	0.2000	0.1833	200	242	113	0.2669	0.7184	33	137	85	237	0.3544	0.8186	0.2911	0.0533	0.5274	0.1187		
CTRL	TOROB	536.5	7642857.1	268250000.0	1.000	0.85	0.80	0.8510	1.0000	279	187	92	0.6708	1.0000	320	214	106	280	0.2817	0.8464	0.5086	0.0429	0.3409	0.1103		
M+M	TOROB	220.0	3142857.1	110000000.0	0.410	0.60	0.55	0.6000	0.5833	700	284	148	0.3611	0.7775	177	147	126	261	0.4656	0.7950	0.3400	0.1126	0.3840	0.1774		
C+M	TOROB	117.5	16782857.1	58750000.0	0.219	0.40	0.40	0.4000	0.4800	288	132	149	0.4698	0.7024	262	177	85	262	0.3664	0.6756	0.2863	0.0802	0.3893	0.2443		
C+C	TOROB	94.5	13500000.0	47250000.0	0.176	0.30	0.25	0.2500	0.3000	253	122	131	0.4822	0.7195	294	97	197	195	0.2821	0.6821	0.1969	0.0872	0.4871	0.2308		
M+M	TOROC	396.5	5642857.1	198250000.0	1.000	0.85	0.85	0.8033	1.0000	289	169	120	0.5848	1.0000	283	248	219	295	0.8831	1.0000	0.6613	0.0565	0.2218	0.0605		
M+M	TOROC	174.0	2485714.3	87000000.0	0.439	0.60	0.55	0.5510	0.5667	600	292	136	0.4658	0.7965	6	123	78	47	0.2510	0.4502	0.3717	0.0546	0.0956	0.1872		
C+M	TOROC	110.0	15714285.7	55000000.0	0.277	0.30	0.30	0.3000	0.3600	286	143	145	0.4965	0.8491	124	151	124	241	0.4232	0.7012	0.3568	0.0664	0.3444	0.2324		
C+C	TOROC	76.0	10857142.9	38000000.0	0.192	0.20	0.20	0.2000	0.2400	246	93	143	0.3941	0.6739	6	106	183	225	0.2183	0.7163	0.1572	0.0611	0.5990	0.2227		
CTRL	TOROA	380.0	54285714.3	190000000.0	1.000	0.90	0.90	0.9000	1.0000	271	206	65	0.7670	1.0000	256	234	23	256	0.8716	0.9105	0.8054	0.0661	0.1051	0.0233		
M+M	TOROA	242.5	3942857.1	121250000.0	0.638	0.70	0.70	0.6500	0.6833	793	278	55	0.2319	0.2603	258	226	32	258	0.5504	0.8769	0.4884	0.0620	0.3101	0.0620		
C+M	TOROA	197.0	2814285.7	98500000.0	0.518	0.45	0.45	0.5000	0.4667	265	107	152	0.4131	0.5435	269	189	86	269	0.4387	0.7032	0.5282	0.0855	0.3494	0.2119		
C+C	TOROA	406.5	5924285.7	53250000.0	0.280	0.50	0.45	0.4500	0.4833	368	54	215	0.2907	0.3641	198	192	96	352	0.3983	0.7962	0.3123	0.0830	0.4743	0.1930		
CTRL	TOROB	494.5	8492857.1	297250000.0	1.000	0.80	0.80	0.8000	1.0000	304	225	79	0.7007	1.0000	269	221	48	269	0.7435	0.8216	0.6491	0.1004	0.1784	0.0781		
M+M	TOROB	380.0	54285714.3	190000000.0	0.639	0.40	0.45	0.4000	0.5208	265	112	153	0.4226	0.5710	287	204	60	265	0.4084	0.7110	0.3244	0.0840	0.4466	0.1450		
C+M	TOROB	245.0	35000000.0	122500000.0	0.412	0.45	0.50	0.4500	0.5833	292	41	251	0.4404	0.8977	278	176	102	276	0.2047	0.3931	0.4565	0.1014	0.2826	0.1594		
C+C	TOROB	122.5	15000000.0	61250000.0	0.206	0.40	0.35	0.4000	0.3833	4792	284	102	0.3592	0.4853	252	152	130	308	0.4889	0.7778	0.4074	0.0815	0.3704	0.1407		
CTRL	TOROC	374.5	53500000.0	187250000.0	1.000	0.85	0.85	0.8500	1.0000	319	231	88	0.7241	1.0000	227	82	270	270	0.7370	0.8474	0.6926	0.0446	0.1304	0.0815		
M+M	TOROC	188.5	2628571.4	94250000.0	0.503	0.50	0.50	0.5000	0.5867	260	120	160	0.4236	0.5918	164	90	178	283	0.2866	0.6872	0.2585	0.0601	0.3387	0.0777		
C+M	TOROC	105.5	15071428.6	57750000.0	0.282	0.45	0.40	0.4000	0.4602	283	106	177	0.3848	0.5172	170	137	227	227	0.4758	0.8999	0.4581	0.0176	0.4371	0.0925		
C+C	TOROC	103.0	14714285.7	51500000.0	0.275	0.35	0.35	0.3500	0.4118	292	142	154	0.4783	0.6716	6	131	154	220	0.3074	0.7865	0.2741	0.0333	0.5222	0.1704		
CTRL	TOROA	470.5	67214285.7	235250000.0	1.000	0.80	0.85	0.8533	1.0000	317	182	135	0.5740	1.0000	243	153	96	243	0.4733	0.6294	0.5359	0.1148	0.1767	0.2510		
M+M	TOROA	286.5	3785714.3	18250000.0	0.503	0.40	0.45	0.4000	0.4167	500	320	154	0.4643	0.8383	309	91	82	287	0.3296	0.5391	0.2135	0.1161	0.3071	0.3653		
C+M	TOROA	166.5	23785714.3	83250000.0	0.354	0.20	0.20	0.2000	0.2400	272	132	140	0.4883	0.8493	285	76	193	232	0.2586	0.3892	0.1724	0.0862	0.3080	0.5216		
C+C	TOROA	194.5	1924285.7	67250000.0	0.288	0.15	0.10	0.1000	0.1167	1400	261	118	0.4531	0.7975	175	76	199	250	0.3300	0.5838	0.0900	0.0720	0.3080	0.5600		
CTRL	TOROB	381.0	5442857.1	190500000.0	1.000	0.85	0.80	0.8333	1.0000	309	235	74	0.6007	0.7898	274	219	55	274	0.4343	0.7993	0.3832	0.0511	0.4161	0.1496		
M+M	TOROB	210.0	30000000.0	105000000.0	0.551	0.60	0.65	0.6000	0.6333	5394	295	176	0.4023	0.5394	259	176	117	308	0.4889	0.7778	0.4074	0.0815	0.3704	0.1407		
C+M	TOROB	126.0	18000000.0	63000000.0	0.331	0.40	0.45	0.4000	0.4167	5000	265	111	0.3428	0.5615	267	136	131	267	0.2602	0.4757	0.2045	0.0598	0.3588	0.1170		
C+C	TOROB	66.5	9500000.0	33250000.0	0.175	0.25	0.20	0.2000	0.2167	2600	279	104	0.3728	0.4997	382	62	220	269	0.2602	0.7332	0.2045	0.0598	0.5688	0.1710		
CTRL	TOROC	495.5	70785714.3	247750000.0	1.000	0.85	0.80	0.8167	1.0000	316	217	99	0.6867	1.0000	207	99	1000	256	0.2109	0.2891	0.2891	0.0000	0.0000	0.0000		
M+M	TOROC	206.0	2942857.1	109000000.0	0.416	0.50	0.50	0.5510	0.5167	6327	304	134	0.4408	0.6419	154	136	166	259	0.4710	0.8131	0.4339	0.0781	0.2422	0.1016		
C+M	TOROC	167.5	2392857.1	83750000.0	0.338	0.40	0.35	0.3510	0.3667	4490	298	125	0.4786	0.6108	138	124	158	258	0.2510	0.4311	0.2309	0.1202	0.3101			

RECOPILACION GENERAL DE DATOS PARA LA TESIS POST REFRIGERACION - " MUESTRAS REFRIGERADAS "

METODO	CODIGO	motilidad ONMS			reaccion ROS			AZUL TRIPAN-ESOSINA			TINCION GIEMSA			TRIPLE TINCION GIEMSA						% triple tndón							
		1 obs	2 obs	3 obs	%	SPZ EV.	Rx+	Rx+	%R+	SPZ EV.	V	M	%V	AI	AD	%AI	VAI	VAD	MAI	MAD	total	%V	%AI	%VAI	%MAD	%MAI	%MAD
C+M	TOROA	0.80	0.85	0.90	0.9167	275	154	121	0.5600	275	193	130	0.9926	221	11	0.9926	92	2	129	9	232	0.4052	0.9526	0.3966	0.0086	0.5560	0.0388
M+M	TOROA	0.15	0.20	0.20	0.1833	307	141	166	0.4593	275	110	163	0.4024	231	207	0.4893	60	10	147	14	203	0.3030	0.8961	0.2597	0.0433	0.6564	0.0066
C+M	TOROA	0.05	0.10	0.10	0.0833	307	128	179	0.4169	295	100	192	0.4875	203	180	0.3867	30	8	150	15	231	0.2032	0.8867	0.2597	0.0394	0.7389	0.0739
C+C	TOROA	0.05	0.00	0.05	0.0333	342	116	226	0.3392	295	84	231	0.2693	216	190	0.2693	65	18	125	18	216	0.3380	0.8796	0.3009	0.0370	0.5787	0.0633
C+M	TOROB	0.90	0.95	0.90	0.9167	376	215	161	0.5718	295	220	77	0.7407	219	201	0.9178	91	4	110	14	219	0.3380	0.9178	0.4155	0.0183	0.5023	0.0839
M+M	TOROB	0.15	0.20	0.20	0.1833	322	152	170	0.4720	310	207	302	0.3323	199	169	0.3492	59	16	110	14	199	0.3769	0.8492	0.2965	0.0804	0.5528	0.0704
C+M	TOROB	0.10	0.15	0.15	0.1333	276	134	142	0.4855	300	114	186	0.3800	124	119	0.8790	19	1	90	14	124	0.1613	0.8790	0.1532	0.0081	0.7258	0.1129
C+M	TOROB	0.05	0.05	0.10	0.0667	183	81	102	0.4426	325	88	237	0.2708	235	197	0.3833	51	12	146	26	235	0.2681	0.8383	0.2170	0.0511	0.6213	0.1106
C+M	TOROC	0.85	0.85	0.80	0.8333	265	181	84	0.6830	265	202	102	0.7702	263	237	0.6833	124	19	113	27	273	0.2637	0.8093	0.4382	0.0671	0.3993	0.0954
M+M	TOROC	0.40	0.35	0.35	0.3667	277	135	142	0.4874	265	161	147	0.4874	273	221	0.5200	65	7	156	45	273	0.2637	0.8093	0.2381	0.0256	0.5714	0.1648
C+M	TOROC	0.30	0.20	0.30	0.2833	279	149	130	0.5341	265	117	141	0.4874	262	197	0.5200	68	11	129	54	262	0.2637	0.2595	0.2595	0.0420	0.4924	0.2061
C+C	TOROC	0.10	0.15	0.15	0.1333	124	39	85	0.3145	265	60	175	0.4874	216	157	0.7269	30	7	127	52	216	0.1713	0.7269	0.1389	0.0324	0.5880	0.2407
C+M	TOROA	0.80	0.85	0.85	0.8333	320	208	112	0.6500	266	191	95	0.6500	244	202	0.8279	86	20	116	22	244	0.4304	0.8279	0.3525	0.0820	0.4754	0.0902
M+M	TOROA	0.25	0.30	0.30	0.2833	305	165	140	0.5410	271	132	139	0.4874	245	210	0.3525	86	5	124	30	245	0.3714	0.8571	0.3510	0.0204	0.5061	0.1224
C+M	TOROA	0.25	0.20	0.20	0.2333	244	116	128	0.4754	253	122	111	0.5200	245	192	0.3525	60	16	132	37	245	0.3102	0.7837	0.2449	0.0653	0.5388	0.1510
C+C	TOROA	0.15	0.10	0.15	0.1333	117	40	77	0.3419	266	89	206	0.3011	187	139	0.4833	29	6	110	42	187	0.1872	0.7463	0.1551	0.0321	0.5882	0.2246
C+M	TOROB	0.90	0.95	0.90	0.9167	287	155	132	0.5401	266	193	76	0.7175	166	144	0.8675	99	4	45	18	166	0.6205	0.8675	0.5964	0.0241	0.2711	0.1084
M+M	TOROB	0.50	0.60	0.55	0.5500	264	108	156	0.4091	295	166	127	0.5066	261	188	0.7203	108	20	80	53	261	0.4904	0.7203	0.4138	0.0766	0.3065	0.2081
C+M	TOROB	0.40	0.35	0.35	0.3667	212	82	130	0.3868	317	118	199	0.3722	237	158	0.6667	58	18	100	61	237	0.3207	0.6667	0.2447	0.0759	0.4219	0.2574
C+M	TOROB	0.15	0.10	0.10	0.1333	254	114	140	0.4488	254	73	181	0.2874	252	174	0.6905	41	8	133	70	252	0.1944	0.6905	0.1627	0.0317	0.5278	0.2774
C+M	TOROC	0.85	0.85	0.90	0.8667	256	146	110	0.5703	266	183	70	0.6833	257	232	0.5200	146	16	86	9	257	0.6504	0.9027	0.5681	0.0623	0.3346	0.0350
M+M	TOROC	0.60	0.65	0.60	0.6167	258	133	125	0.5155	266	155	101	0.6167	257	198	0.5926	110	19	88	40	257	0.5019	0.7704	0.4280	0.0739	0.3424	0.1556
C+M	TOROC	0.40	0.35	0.35	0.3667	265	125	140	0.4717	266	110	139	0.4874	258	174	0.6744	88	24	86	60	258	0.4341	0.6744	0.3411	0.0930	0.3333	0.2326
C+C	TOROC	0.20	0.20	0.20	0.2000	197	66	131	0.3350	266	98	178	0.4874	285	196	0.6877	87	29	109	60	285	0.4070	0.6877	0.3053	0.1018	0.3825	0.2105
C+M	TOROA	0.95	0.95	0.90	0.9333	291	189	102	0.6498	273	248	25	0.5804	266	251	0.9438	167	7	84	8	266	0.6541	0.9438	0.6278	0.0263	0.3158	0.0301
M+M	TOROA	0.65	0.65	0.70	0.6667	285	99	186	0.3474	276	157	113	0.5311	255	232	0.3958	124	11	108	12	255	0.5294	0.9098	0.4863	0.0431	0.4235	0.0471
C+M	TOROA	0.50	0.50	0.50	0.5000	286	129	157	0.4510	266	141	124	0.5311	245	188	0.5717	99	21	89	36	245	0.4898	0.7673	0.4041	0.0857	0.3633	0.1469
C+C	TOROA	0.40	0.50	0.45	0.4500	262	79	183	0.3015	266	138	128	0.5488	275	220	0.5800	99	24	121	31	275	0.4473	0.8000	0.3600	0.0873	0.4400	0.1127
C+M	TOROB	0.85	0.90	0.90	0.8833	260	159	101	0.6115	290	222	68	0.7655	241	214	0.7203	150	5	64	22	241	0.6432	0.8880	0.6224	0.0207	0.2656	0.0913
M+M	TOROB	0.55	0.50	0.50	0.5167	289	116	173	0.4014	276	145	132	0.5293	267	214	0.5311	88	11	126	42	267	0.3708	0.8015	0.3296	0.0412	0.4719	0.1573
C+M	TOROB	0.35	0.40	0.40	0.3833	274	94	180	0.3431	275	161	114	0.5855	247	144	0.5830	44	22	100	81	247	0.2672	0.5830	0.1881	0.0891	0.4049	0.3279
C+M	TOROB	0.40	0.40	0.40	0.4000	275	122	153	0.4436	274	133	141	0.4854	261	191	0.7318	100	21	91	49	261	0.4636	0.7318	0.3831	0.0805	0.3487	0.1877
C+M	TOROC	0.95	0.90	0.90	0.9167	294	194	100	0.6399	294	220	93	0.6399	264	241	0.9129	143	8	98	15	264	0.5720	0.9129	0.5417	0.0303	0.3712	0.0968
M+M	TOROC	0.50	0.60	0.60	0.5667	272	142	130	0.5221	266	155	143	0.5221	259	234	0.5935	154	11	80	14	259	0.6371	0.9035	0.5946	0.0425	0.3089	0.0541
C+M	TOROC	0.35	0.40	0.35	0.3667	305	121	184	0.3967	266	130	147	0.4874	265	176	0.6642	61	27	115	62	265	0.3321	0.6642	0.2302	0.1019	0.4340	0.2340
C+C	TOROC	0.30	0.30	0.35	0.3167	273	131	142	0.4799	266	115	164	0.4874	214	147	0.6869	26	13	121	54	214	0.1822	0.6869	0.1215	0.0607	0.5654	0.2523
C+M	TOROA	0.70	0.65	0.65	0.6667	303	166	135	0.5515	266	140	196	0.6167	285	269	0.9438	189	9	80	7	285	0.6947	0.9438	0.6632	0.0316	0.2807	0.0246
M+M	TOROA	0.40	0.45	0.40	0.4167	318	169	149	0.5314	282	91	191	0.5272	258	234	0.9070	125	10	109	14	258	0.5233	0.9070	0.4845	0.0388	0.4225	0.0543
C+M	TOROA	0.25	0.25	0.20	0.2333	302	140	162	0.4636	273	99	206	0.3913	289	183	0.7657	95	24	88	32	239	0.4979	0.7657	0.3975	0.1004	0.3682	0.1398
C+C	TOROA	0.05	0.05	0.00	0.0333	228	104	120	0.4643	275	65	210	0.4844	266	213	0.5800	92	22	121	31	266	0.4286	0.8000	0.3459	0.0827	0.4549	0.1165
C+M	TOROB	0.85	0.85	0.90	0.8667	299	205	94	0.6856	307	220	87	0.7166	240	219	0.9125	153	7	66	14	240	0.6667	0.9125	0.6375	0.0292	0.2750	0.0583
M+M	TOROB	0.55	0.60	0.60	0.5833	290	119	171	0.4103	281	168	113	0.5979	257	210	0.4717	88	12	122	35	257	0.3891	0.8171	0.3424	0.0467	0.4747	0.1362
C+M	TOROB	0.30	0.35	0.30	0.3167	273	87	186	0.3187	264	105	159	0.3977	254	161	0.6339	56	20	105	73	254	0.2992	0.6339	0.2205	0.0787	0.4134	0.2874
C+C	TOROB	0.20	0.25	0.20	0.2167	242	80	162	0.3306	293	52	241	0.1775	276	192	0.8492	104	22	88	62	276	0.4505	0.6957	0.3768	0.0797	0.3188	0.2486
C+M	TOROC	0.85	0.90	0.90	0.8833	273	162	111	0.5934	266	266	153	0.6167	271	249	0.9188	150	9	99	13	271	0.5867	0.9188	0.5535	0.0332	0.3653	0.0480
M+M	TOROC	0.55	0.50	0.50	0.5167	295	131	164	0.4441	266	146	132	0.5167	242	199	0.4323	99	13	100	30	242	0.4628	0.8223	0.4091	0.0537	0.4132	0.1240
C+M	TOROC	0.40	0.40	0.40	0.4000	306	146	160	0.4771	266	121	147	0.4874	278	187	0.9129	70	26	117	65	27						

RECOPILACION GENERAL DE DATOS PARA LA TESIS POST CONGELAMIENTO - "MUESTRAS CONGELADAS"

METODO	CODIGO	1 obs	2 obs	3 obs	%	SPZ EV.	PK+	PK+	PK+	reaction HOS	SPZ EV.	AV	M	J	AV	SPZ EV.	AI	AD	%AI	VAI	VAD	MAI	MAD	TOTAL	SV	%AI	%VAI	%VAD	%triple tñan	%MAD	Conteo	F. TINCION QUINA GRAMA*	nF	sf+	
CTRL	TOROA	0.55	0.50	0.50	0.5167	302	142	160	0.4700	150	160	0.4853	150	160	0.4853	253	188	68	0.7433	82	31	106	34	253	0.4468	0.7433	0.3241	0.1225	0.4190	1.1344	13	63	70	0.41758	
MHM	TOROA	0.05	0.10	0.10	0.0833	140	62	78	0.4929	49	207	0.1937	234	170	0.7265	48	17	122	0.4726	48	17	122	47	234	0.2778	0.7265	0.2081	0.0276	0.5214	0.4009	136	70	66	0.41261	
C-M	TOROA	0.05	0.00	0.05	0.0333	393	140	251	0.3581	21	257	0.0753	227	124	0.5463	20	12	104	0.4100	20	12	104	91	227	0.1410	0.5463	0.0881	0.0529	0.4581	0.4009	136	73	65	0.41589	
C-C	TOROA	0.05	0.00	0.05	0.0333	277	117	160	0.4424	54	289	0.1541	225	133	0.5911	17	6	116	0.4100	20	12	104	86	225	0.1022	0.5911	0.0267	0.1956	0.4100	0.3822	54	71	77	0.41673	
CTRL	TOROB	0.60	0.60	0.60	0.6000	238	108	130	0.4558	329	170	0.5167	205	168	0.37	0.8195	89	16	108	21	205	0.5073	0.8195	0.4293	0.0780	0.3902	0.1024	0.1024	136	70	80	0.46687			
MHM	TOROB	0.10	0.10	0.10	0.1167	189	93	96	0.4321	274	39	0.1423	230	137	0.5957	29	10	108	0.37	205	0.1696	0.5957	0.1024	0.0435	0.4696	0.3609	0.136	66	71	81	0.48077				
C-M	TOROB	0.05	0.05	0.05	0.0500	285	140	145	0.4912	277	30	0.1083	233	127	0.5451	27	14	125	0.4100	20	12	104	79	233	0.2318	0.5451	0.1159	0.0202	0.3469	0.3391	156	75	81	0.48077	
C-C	TOROB	0.05	0.00	0.05	0.0333	264	127	137	0.4811	299	34	0.1137	245	146	0.99	0.5959	21	14	125	0.4100	20	12	104	85	245	0.1429	0.5959	0.0857	0.0571	0.3469	0.3391	171	71	60	0.44198
CTRL	TOROC	0.40	0.40	0.40	0.4167	305	149	156	0.4885	149	207	0.207	256	175	0.81	0.6836	82	30	93	51	256	0.4375	0.6836	0.3203	0.1172	0.3633	0.1992	0.1992	136	71	63	0.41868			
MHM	TOROC	0.20	0.20	0.20	0.2167	312	159	153	0.4906	62	204	0.2167	243	149	0.6395	58	14	98	0.40	233	0.2318	0.6395	0.1183	0.0172	0.4206	0.3433	0.127	67	66	60	0.45256				
C-M	TOROC	0.10	0.10	0.10	0.1167	292	135	157	0.4623	62	204	0.2167	240	149	0.6395	58	14	98	0.40	233	0.2318	0.6395	0.1183	0.0172	0.4206	0.3433	0.127	67	66	60	0.45256				
C-C	TOROC	0.00	0.00	0.05	0.0167	178	47	131	0.2640	36	216	0.1167	236	123	0.5212	15	2	108	0.11	236	0.0721	0.5212	0.0636	0.0085	0.4576	0.4703	0.133	58	55	55	0.41327				
CTRL	TOROA	0.55	0.60	0.55	0.5667	314	132	182	0.4204	257	118	0.4853	259	152	0.7589	40	26	112	0.81	259	0.2548	0.7589	0.1594	0.1004	0.4324	0.3127	0.3127	136	70	61	0.43468				
MHM	TOROA	0.30	0.30	0.35	0.3167	268	123	145	0.4590	227	89	0.3167	255	170	0.6667	47	8	123	0.77	255	0.2157	0.6667	0.1843	0.0314	0.4824	0.3020	0.3020	136	55	65	0.41483				
C-M	TOROA	0.10	0.10	0.10	0.1167	326	152	174	0.4663	60	204	0.2167	234	134	0.5726	44	19	90	0.81	234	0.2692	0.5726	0.1880	0.0812	0.3846	0.3462	0.3462	137	47	76	0.41111				
C-C	TOROA	0.05	0.05	0.05	0.0333	271	105	166	0.3875	58	235	0.0931	172	73	0.9424	8	10	65	0.89	172	0.1047	0.9424	0.0465	0.0581	0.3729	0.5174	0.5174	131	51	65	0.41868				
MHM	TOROB	0.70	0.65	0.65	0.6667	329	169	160	0.5137	649	328	0.321	321	0.5054	261	192	69	0.7356	113	27	79	42	261	0.5364	0.7356	0.4430	0.1084	0.3077	0.1609	117	66	51	0.46410		
MHM	TOROB	0.30	0.25	0.30	0.2833	314	145	169	0.4618	267	95	0.3624	254	140	0.5512	69	30	77	0.84	254	0.3661	0.5512	0.2480	0.1181	0.3031	0.3207	0.3207	127	71	56	0.45906				
C-M	TOROB	0.05	0.05	0.05	0.0500	270	110	160	0.4074	348	75	0.2155	275	184	0.91	0.6691	60	14	124	0.77	275	0.2691	0.6691	0.2182	0.0509	0.4509	0.2800	0.2800	131	60	71	0.45802			
C-C	TOROB	0.05	0.00	0.05	0.0167	256	117	139	0.4570	312	74	0.2372	269	171	0.6357	43	14	128	0.84	269	0.2119	0.6357	0.1599	0.0520	0.4758	0.3123	0.3123	104	55	49	0.42885				
CTRL	TOROC	0.20	0.30	0.25	0.2500	266	118	148	0.4436	72	245	0.1137	268	143	0.5336	76	18	67	107	268	0.3507	0.5336	0.2836	0.0672	0.2500	0.3993	0.3993	126	56	70	0.44484				
MHM	TOROC	0.20	0.15	0.15	0.1667	280	118	162	0.4214	52	228	0.272	272	154	0.5662	41	15	113	103	272	0.2059	0.5662	0.1507	0.0551	0.4154	0.3787	0.3787	127	55	66	0.48488				
C-M	TOROC	0.05	0.05	0.05	0.0500	246	88	158	0.3577	63	260	0.1167	264	131	0.4962	41	17	90	0.90	264	0.2197	0.4962	0.1553	0.0644	0.3409	0.4394	0.4394	133	45	70	0.41138				
CTRL	TOROA	0.70	0.75	0.70	0.7167	309	186	123	0.6010	323	236	0.7167	284	188	0.7590	145	42	53	0.74	284	0.7083	0.7590	0.5492	0.1591	0.3008	0.0909	0.0909	136	64	81	0.41848				
MHM	TOROA	0.40	0.35	0.40	0.3833	278	67	211	0.2410	240	102	0.4331	269	86	0.6107	62	42	98	0.60	269	0.3969	0.6107	0.2366	0.1693	0.3740	0.2290	0.2290	136	55	78	0.41463				
C-M	TOROA	0.05	0.10	0.05	0.0833	289	111	176	0.3868	275	55	0.2090	252	40	0.1597	4	18	36	0.94	252	0.0873	0.1597	0.0159	0.0714	0.1429	0.7698	0.7698	136	61	77	0.41039				
C-C	TOROA	0.05	0.05	0.05	0.0333	326	146	180	0.4979	277	40	0.237	275	157	0.2073	16	17	41	201	275	0.1200	0.2073	0.0582	0.0618	0.1491	0.7309	0.7309	127	55	67	0.41039				
CTRL	TOROB	0.60	0.65	0.60	0.6167	244	118	126	0.4836	246	134	0.5447	248	158	0.90	0.6371	90	60	68	30	248	0.6048	0.6371	0.3629	0.2419	0.2742	0.1210	0.1210	140	67	73	0.47857			
MHM	TOROB	0.40	0.40	0.35	0.3833	335	134	201	0.4000	288	47	0.1633	250	46	0.204	0.1840	12	30	34	174	250	0.1680	0.1840	0.0480	0.1200	0.1360	0.6960	0.6960	136	55	81	0.40441			
C-M	TOROB	0.15	0.10	0.10	0.1167	295	107	188	0.3627	256	95	0.2020	245	57	0.88	0.2327	5	24	52	164	245	0.1184	0.2327	0.0204	0.0980	0.2122	0.6694	0.6694	136	55	81	0.44039			
C-C	TOROB	0.05	0.00	0.05	0.0167	331	108	223	0.3263	278	52	0.1871	250	60	0.190	0.2400	6	26	54	164	250	0.1180	0.2400	0.0240	0.1040	0.2160	0.6560	0.6560	129	64	65	0.49612			
MHM	TOROC	0.60	0.55	0.60	0.5833	342	155	187	0.4332	106	173	0.5167	255	122	0.33	0.4784	28	46	94	87	255	0.2902	0.4784	0.1098	0.1804	0.3686	0.3412	0.3412	131	51	67	0.43220			
MHM	TOROC	0.35	0.40	0.40	0.3833	265	107	158	0.4038	72	219	0.2167	261	122	0.33	0.4674	36	18	86	121	261	0.2069	0.4674	0.1379	0.0650	0.3295	0.4636	0.4636	137	67	66	0.43726			
C-M	TOROC	0.15	0.10	0.10	0.1167	291	125	166	0.4296	48	228	0.2167	264	99	0.165	0.3750	10	4	89	161	264	0.0530	0.3750	0.0379	0.0152	0.3371	0.6098	0.6098	123	45	78	0.41688			
C-C	TOROC	0.05	0.05	0.05	0.0333	266	123	143	0.4624	35	261	0.1167	270	115	0.55	0.4259	6	5	109	150	270	0.0407	0.4259	0.0222	0.0185	0.4037	0.5556	0.5556	133	61	78	0.41888			
CTRL	TOROA	0.45	0.45	0.40	0.4333	328	184	144	0.5212	124	124	0.4793	275	202	0.71	0.7399	83	16	119	55	273	0.3626	0.7399	0.3040	0.0586	0.4359	0.2015	0.2015	0						