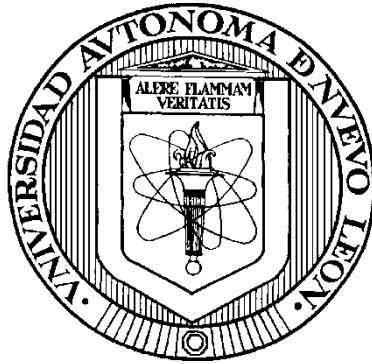


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE
ESPERMATOZOIDES PORTADORES DEL CROMOSOMA X DE LOS
PORTADORES DEL CROMOSOMA Y**

Por

CARLOS ALBERTO CRUZ FLORES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA

AGOSTO 2021

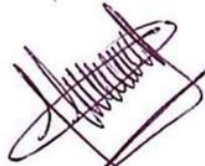
**ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE
ESPERMATOZOIDES PORTADORES DEL CROMOSOMA X DE LOS
PORTADORES DEL CROMOSOMA Y**

Aprobación de tesis:




Dra. C. María de Jesús Loera Arias

Director de tesis



Dr. C. Salomón Álvarez Cuevas

Co-Director de tesis



Dr. C. Iván Alberto Marino Martínez

Comisión de tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE
ESPERMATOZOIDES PORTADORES DEL CROMOSOMA X DE LOS
PORTADORES DEL CROMOSOMA Y**

Presentado por:

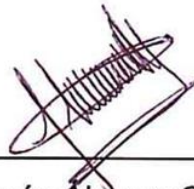
Q.C.B. Carlos Alberto Cruz Flores

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. María de Jesús Loera Arias y la co-dirección del Dr. C. Salomón Álvarez Cuevas.



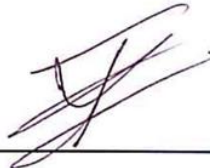
Dra. C. María de Jesús Loera Arias

Director



Dr. C. Salomón Álvarez Cuevas

Co-director



Dr. C. Iván Alberto Marino Martínez

Comisión de Tesis

DEDICATORIA

A mis padres

Por apoyarme incondicionalmente, y brindarme la motivación, el consejo y el amor constante y necesario para llegar hasta donde estoy ahora.

RESUMEN

Carlos Alberto Cruz Flores
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES PORTADORES DEL CROMOSOMA X DE LOS PORTADORES DEL CROMOSOMA Y

Número de páginas: 73

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Propósito y método de estudio: La separación eficaz de los espermatozoides portadores de cromosomas X e Y es un tema de atención en la reproducción asistida, con el fin de generar un balance en la proporción sexual o influenciar la concepción de un producto menos susceptible a enfermedades. El objetivo del presente estudio fue comparar diversas técnicas de separación de espermatozoides portadores del cromosoma X de los portadores del cromosoma Y, que cumplen con la característica de ser sencillas, seguras y accesibles para los laboratorios clínicos. Para ello, se obtuvieron muestras de líquido seminal de donadores sanos, con las cuales se produjeron fracciones hipotéticamente enriquecidas en espermatozoides portadores de un cromosoma específico mediante las diversas técnicas incluidas en el estudio. Para determinar la eficiencia de las técnicas, se evaluarán los siguientes parámetros en las fracciones enriquecidas, los cuales fueron comparados contra las muestras iniciales y entre grupos: 1) tasa de recuperación de espermatozoides viables en parámetros de motilidad, vitalidad y morfología mediante un análisis seminológico, 2) índice de fragmentación de ADN mediante la prueba de dispersión de la cromatina espermática, y 3) pureza o proporción sexual de espermatozoides mediante un sexado y el análisis de los electroferogramas obtenidos en la amplificación del gen del amelogenina mediante técnica de PCR.

Conclusiones: El método de gradientes de densidad es el más eficiente para la recuperación de espermatozoides viables con características óptimas de motilidad, vitalidad y morfología. El método de gradientes de densidad y el método de swim-up obtuvieron una mayor reducción en el porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN. Ninguno de los tres métodos evaluados permitió el enriquecimiento de fracciones en espermatozoides portadores de un cromosoma específico; sin embargo, es necesario evaluar si nuevas modificaciones a las condiciones del método permiten una separación más efectiva.

“Nunca se sienta avergonzado por intentarlo y fracasar, porque quien nunca ha fallado es quien nunca lo ha intentado.”

—Og Mandino

“Los cuentos de hadas son más que verdaderos: no porque nos digan que existen los dragones, sino porque nos dicen que los dragones pueden ser derrotados.”

—Neil Gaiman

“Corta la cabeza de un lobo y todavía tendrá el poder de morder.”

—Hayao Miyazaki

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco enormemente a toda mi comisión de tesis, el Dr. C. Salomón Álvarez, la Dra. C. María de Jesús Loera y el Dr. C. Iván Marino por apoyarme ampliamente en la planeación y el desarrollo del proyecto, en altas y bajas, bajo presura o bajo calma. Muchísimas gracias por todo su apoyo, las enseñanzas y los consejos abundantes que me han dejado, por siempre disponer de tiempo para guiarme y asesorarme en el camino y, por sobre todo, la paciencia infinita que me han dado.

A mi asesor y profesor el Dr. C. Salomón Álvarez de manera especial por la gigantesca confianza que siempre me ha demostrado, las oportunidades que me ha dado de superarme y crecer profesionalmente en esta área, el apoyo infinito que me ha proporcionado desde mucho tiempo antes al proyecto en mi trabajo y en las decisiones y propuestas que he aportado. Gracias por nunca cerrarme las puertas del departamento de Patología, y hacerme sentir siempre incluido dentro del mismo.

A mi asesora y tutora la Dra. C. María de Jesús Loera, con cariño la Dra. Marichuy, por su calidad humana y asesoría incondicional; por estar siempre a disposición para apoyarme a sacar adelante el proyecto, para resolver mis dudas incluso en las horas nocturnas, y para escuchar mis preocupaciones y alivios. Su guía iluminó el camino en muchas ocasiones.

A mi asesor y guía, el Dr. Iván Marino, por su disposición, apoyo, sugerencias y enseñanzas en el desarrollo del proyecto, por su confianza y por abrirme las puertas a su laboratorio para poder desarrollar mi aprendizaje y sacar el trabajo adelante.

De manera muy especial quiero agradecer a mis profesores y compañeros de trabajo en el departamento de Patología: a Gemma y a Silvita “la Chivis” por compartir sus consejos, su tiempo, por apoyarme incluso dentro del laboratorio, y por aliviar los momentos tensos, estresantes y complicados con momentos

amenos llenos de comida, risas, largos debates y charlas; y a la Química Claudia por su constante ánimo y guía espiritual.

A la Dra. Lourdes Chávez generosa colaboración para el logro de este proyecto, y la M. C. Carmen Muñoz por el ánimo puesto para transmitirme sus enseñanzas en varios procedimientos del trabajo; por quienes fue posible la conclusión exitosa de este proyecto.

A mis compañeros de generación, en especial a Emmanuel, Gloria y Vanessa, por tantos momentos compartidos en los que no faltaron los tropiezos, las risas, las frustraciones, las comidas, el aprendizaje, y sobre todo, una buena amistad.

A todos mis profesores del departamento de Histología por compartir su experiencia y sus conocimientos durante estos dos años.

A todos mis amigos que estuvieron dándome su constante apoyo, ánimo y buenos deseos durante el transcurso de todo este trabajo

Finalmente, y no con menos ahínco, agradezco infinitamente a mi familia, mis padres que fueron mi apoyo esencial para poder construir el rumbo de mi vida apoyando cada una de mis decisiones, y mi hermana Alejandra que estuvo presente en todo momento haciendo hasta lo imposible en casa.

CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Selección de sexo.....	1
1.1.1. Selección de sexo preimplantacional.....	4
1.1.2. Selección de sexo preconcepcional.....	7
1.1.2.1. Método basado en el contenido cromosómico.....	8
1.1.2.2. Métodos basados en la motilidad y densidad.....	9
1.1.2.3. Métodos basados en otras características espermáticas....	13
1.2. Métodos de evaluación.....	13
1.3. Antecedentes.....	16
1.4. Justificación.....	21
1.5. Objetivo general.....	22
1.6. Objetivos específicos.....	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1. Estrategia General.....	23
2.2. Selección de donadores.....	24
2.3. Obtención de fracciones enriquecidas.....	26
2.4. Evaluación de fracciones procesadas.....	31
2.4.1. Determinación de los parámetros seminales en las fracciones procesadas.....	31
2.4.2. Determinación de la fragmentación de ADN en las fracciones procesadas mediante la prueba de SCD.....	33
2.4.3. Determinación de la pureza de las fracciones procesadas.....	34
3. RESULTADOS.....	37
3.1. Comparación de parámetros seminales en las fracciones procesadas.....	37
3.2. Comparación del DFI espermático en las fracciones procesadas.....	39
3.3. Comparación de las proporciones sexuales de contenido genético en las fracciones procesadas.....	41

3.4. Comparación de las proporciones sexuales de contenido genético en las fracciones procesadas.....	43
4. DISCUSIÓN.....	45
5. CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52
APÉNDICES.....	58
APÉNDICE A. Procedimiento de espermatobioscopía directa o seminograma.....	59
APÉNDICE B. Técnica de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCD)	66
APÉNDICE C. Procedimiento de extracción orgánica fenol-cloroformo.....	70
APÉNDICE D. Procedimiento de cuantificación de ADN.....	71
APÉNDICE E. Procedimiento de amplificación del gen de la amelogenina.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Método de Centrifugación en Gradientes de Densidad.....	10
Figura 2. Método de Swim-Up.....	11
Figura 3. Estrategia general.....	24
Figura 4. Técnica de Swim-Up Directo.....	28
Figura 5. Técnica de Swim-Up y Centrifugación.....	30
Figura 6. Técnica de Gradientes de Densidad.....	31
Figura 7. Nucleoides de espermatozoides humanos obtenidos con el procedimiento de SCD y teñidos mediante Wright.....	34
Figura 8. Morfología observada en los espermatozoides mediante la técnica de Papanicolaou.....	38
Figura 9. Tasas de recuperación de espermatozoides óptimos para los parámetros de motilidad, vitalidad y morfología.....	39
Figura 10. Micrografías representativas del daño al ADN observado en las fracciones procesadas, mediante la prueba de SCD.....	40
Figura 11. Alteración de los FDI en las fracciones procesadas.....	41
Figura 12. Electroferograma de la amplificación del gen de la amelogenina....	42
Figura 13. Falta de enriquecimiento en las fracciones procesadas.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Políticas conocidas de selección de sexo a nivel de país.....	1
Tabla 2. Parámetros seminales, integridad del ADN y pureza de las fracciones obtenidas de espermatozoides.....	44

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
a-CGH	Hibridación Genómica Comparativa de Matrices
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ART	Técnicas de Reproducción Asistida
ASH	Albúmina Sérica Humana
ATP	Trifosfato de Adenosina
CSW	Swim-Up Convencional
DFI	Índice de Fragmentación de ADN
DGC	Centrifugación de Gradientes de Densidad
DGP	Diagnóstico Genético Preimplantacional
DSW	Swim-Up Directo
FISH	Hibridación Fluorescente In Situ
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
ICSI	Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides
IUI	Inseminación Intrauterina
INM	Inmóvil
IVF	Fertilización In Vitro
M	Molar
mL	Mililitro
MP	Móvil Progresivo
ng	Nanogramo
NGS	Secuenciación de Próxima Generación
NP	Móvil No Progresivo
OMS	Organización Mundial de la Salud

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGS	Selección Genética Preimplantacional
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	PCR en Tiempo Real
RFU	Unidades Relativas de Fluorescencia
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SCD	Dispersión de la Cromatina Espermática
SCSA	Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática
SDF	Fragmentación del ADN Espermático
spz	Espermatozoides
STR	Regiones Microsatélite, o Repeticiones Cortas en Tándem
SUC	Swim-Up y Centrifugación

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Selección de sexo

En las últimas décadas, ha existido un progreso lento en el desarrollo de técnicas de reproducción asistida (ART, por sus siglas en inglés *Assistive Reproductive Technologies*) destinadas a seleccionar el sexo de un producto de concepción en humanos.

Este desarrollo ha llevado a reemplazar métodos de selección como el ultrasonido o el diagnóstico prenatal, que es seguido de un aborto selectivo del neonato de sexo no deseado¹. Entre las técnicas desarrolladas se encuentran métodos de selección de sexo preconcepcional (selección de espermatozoides o *sperm-sorting*), y preimplantacional (selección genética preimplantacional, PGS, por sus siglas en inglés *Preimplantational Genetic Selection*).

El método de PGS es altamente efectivo, sin embargo, es invasivo, costoso y resulta en el descarte de embriones sanos. Las técnicas de selección espermática evitan los dilemas éticos tanto de la pérdida de vida embrionaria o fetal, como del uso de procedimientos invasivos.

La selección de sexo por razones médicas, como la prevención de enfermedades hereditarias ligadas al sexo, es ampliamente considerada como aceptable, e incluso se encuentra regulada en diversos países², principalmente del continente europeo (Tabla 1). Sin embargo, la selección de sexo por razones no-médicas, como el balance familiar o la preferencia por un sexo particular del hijo de los futuros padres, ha sido un tema recurrente de debate en el ámbito político-social y en el área de la bioética en diversos países.

Tabla 1

Políticas conocidas de selección de sexo a nivel de país

Región	País	Política*	Región	País	Política*
África	Egipto	Uso médico	Europa	Bielorrusia	Uso médico
	Marruecos	Prohibido		Bulgaria	Uso médico
	Sudáfrica	Uso médico		Croacia	Uso médico
	Túnez	Uso médico		Dinamarca	Uso médico
	Yemen	Uso médico		Finlandia	Uso médico
Asia	Arabia Saudí	Uso médico		Francia	Uso médico
	Bahréin	Uso médico		Grecia	Uso médico
	China	Prohibido		Hungría	Uso médico
	Corea del Sur	Prohibido		Letonia	Uso médico
	Emiratos Árabes Unidos	Uso médico		Macedonia	Uso médico
	India	Uso médico		Malta	Prohibido
	Líbano	Prohibido		Montenegro	Uso médico
	Malasia	Uso médico		Noruega	Uso médico
	Omán	Prohibido		Países Bajos	Uso médico
	Singapur	Uso médico		Reino Unido	Uso médico
Europa	Siria	Uso médico	Rumania	Prohibido	
	Sri Lanka	Uso médico	Rusia	Uso médico	
	Tailandia	Uso médico	Suecia	Uso médico	
	Taiwán	Uso médico	Suiza	Prohibido	
	Tayikistán	Uso médico	América	Canadá	Uso médico
	Vietnam	Prohibido	Cuba	Uso médico	
	Alemania	Uso médico	Australia	Uso médico	
Europa	Austria	Prohibido	Oceanía	Nueva Zelanda	Prohibido

* “Uso médico”: La selección de sexo es permitida para razones médicas pero prohibida para usos sociales (Modificado de Darnovsky, 2009³, actualizado con información de *Center for Genetics and Society*⁴)

En México, hay una falta de legislación en materia de reproducción asistida. Se ha sugerido la implementación de una normativa para estos procedimientos, con diversos enfoques entre los que se encuentran la regulación y control de los centros de reproducción asistida, de las técnicas de reproducción asistida (incluida la selección sexo), y de los individuos y parejas que pueden recurrir a este tipo procedimientos; así como la capacitación requisitada del equipo multidisciplinario para la atención en la materia⁵.

Entre los argumentos éticos que conciernen a la selección de sexo, se discute ampliamente el sesgo hacia la selección de varones que se ha reportado históricamente en diversas regiones, basado en valores sociales, económicos y culturales; con la posible generación de desequilibrios importantes en la proporción normal de sexos.

Se han ofrecido argumentos sobre la autonomía del paciente, la libertad reproductiva, la aceptación paternal e inclusive la disminución del aborto y la destrucción de embriones (mediante la selección de espermatozoides) a favor de la práctica. Los riesgos del procedimiento, el sesgo en la elección del sexo, el sexismo, las violaciones a la dignidad humana, la no aceptación de la descendencia, y las cuestiones de justicia plantean preocupaciones sobre la práctica^{1,6,7}. Esto último ha limitado el alcance de un consenso sobre el carácter ético del uso de las ART para la selección de sexo por razones no-médicas.

Por otro lado, el costo de las ART ha exhibido diferencias notables en el mundo, basado en el sistema de salud, el desarrollo de los países y el nivel de subsidio público y de terceros. México se ha representado como uno de los

países con mayor asequibilidad y menor utilización de los tratamientos de ART⁸. Este factor, en conjunto con la disponibilidad del uso de procedimientos de ART (entre ellos la selección de sexo) en diversos países, ya sea debido a barreras económicas o legales, ha promovido entre los ciudadanos la búsqueda de procedimientos de ART en otros países, conocido globalmente como *Cross-border Reproduction*^{2,9}.

1.1.1. Selección de sexo preimplantacional

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) permite conocer el contenido genético y cromosómico de embriones obtenidos mediante técnicas de fertilización in vitro (IVF, por sus siglas en inglés *In Vitro Fertilization*) antes de ser transferidos al útero materno, sin afectar negativamente a su desarrollo o capacidad de implantación¹⁰.

A finales de los años noventa, el uso de esta tecnología empezó a aplicarse como herramienta adicional para la selección de embriones euploides en grupos de pacientes considerados de “mal pronóstico”¹⁰. Sin embargo, la determinación del género durante este procedimiento introdujo la selección del sexo entre las opciones de decisión en las parejas que utilizaban ART, generando la PGS².

La PGS requiere la realización de un ciclo de FIV, y en la mayoría de los casos implica una inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) previa a la obtención de embriones, y una reducción fetal selectiva posterior al DGP^{2,10};

lo cual incrementa particularmente el costo y la asequibilidad del procedimiento. Sin embargo, esta metodología es más precisa y confiable que otros métodos de selección de sexo, teniendo una veracidad de 95-97% y siendo exitosa hasta en el 99% de los casos; con una tasa de gestación alrededor del 20-25%¹¹.

En este procedimiento se realiza una punción ovárica transvaginal para la extracción de los ovocitos e inseminación de estos. Los cigotos se cultivan en el laboratorio hasta que se consiguen embriones de 6-8 células (día 3). En este estadio se realiza biopsia embrionaria de 1 o 2 blastómeros, y se lleva a cabo el análisis para observar la dotación de cromosomas sexuales de las células y los embriones; los embriones se mantienen en cultivo hasta la obtención de resultados¹¹.

El procedimiento de biopsia puede realizarse en diversos estadios: cuerpos polares del ovocito/cigoto, blastómeros de embriones en etapa de escisión (3 días de desarrollo) y células del trofotodermo del blastocisto (5-6 días de desarrollo)^{10,12,13}; siendo mayormente realizada en la etapa de escisión.

El análisis cromosómico por su parte se obtiene mediante técnicas de biología molecular, o de citogenética en menor grado. La hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés *Fluorescent in situ hybridization*) es la técnica utilizada para analizar los cromosomas en las células biopsiadas y es el método de elección para la selección de sexo de embriones. También se utiliza para la detección de anomalías cromosómicas y aneuploidías¹¹⁻¹³.

Para la realización del FISH, se lleva a cabo una desnaturalización del centrosoma de los cromosomas y posteriormente, una hibridación con sondas específicas de cada tipo de cromosoma (X y Y), unidas a fluorocromos que se ponen de manifiesto al ser excitados en un microscopio de fluorescencia¹¹.

Por otro lado, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) se aplica principalmente para la detección de enfermedades monogénicas, y en un menor grado, para detectar la presencia o ausencia del cromosoma Y, amplificando una secuencia específica de este cromosoma. Esto se realiza mediante el uso de enzimas de restricción, y la amplificación de las secuencias de ADN obtenidas, para su posterior visualización mediante PCR en tiempo real (qPCR) o electroforesis. Sin embargo, se ha visto obstaculizada por problemas de contaminación y pérdida de alelos^{11,13}.

En los últimos años, han surgido nuevas tecnologías que son más eficientes que FISH y permiten el análisis de todos los cromosomas de núcleos en interfase, empleando métodos como arreglos de hibridación genómica comparativa de matrices (a-CGH, por sus siglas en inglés *Array Comparative Genomic Hybridisation*), o la secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés *Next generation sequencing*)^{10,12}.

1.1.2. Selección de sexo preconcepcional

En esta etapa, se lleva a cabo una selección de espermatozoides con cromosoma X o Y, en función del sexo deseado, los cuales van a determinar el sexo del embrión. Esta selección se basa principalmente en el enriquecimiento de las muestras con espermatozoides portadores de un cromosoma sexual específico.

Las técnicas de separación de espermatozoides surgieron inicialmente con el propósito de incrementar la tasa de éxito de las ART específicas (FIV, ICSI, inseminación intrauterina (IIU))¹⁴. Éstas se han basado en diversas características específicas y propiedades de los espermatozoides que se han ligado fuertemente a la fertilidad, como la motilidad, la bioquímica de superficie, la morfología, la expresión proteica y el genotipo.

Para evaluar la eficiencia de estas técnicas, se ha tomado consideración de varios factores dependiendo el propósito de cada técnica, teniendo como ejemplo la tasa de recuperación de espermatozoides en las fracciones finales, la calidad de los parámetros seminales obtenidos y factores asociados al daño al material genético, así como el tiempo de procesamiento de las muestras; este último correlacionado con la viabilidad espermática, debido a que procesos más largos aumentan la probabilidad de daño de los espermatozoides.

El uso en diferentes ART de fracciones enriquecidas en espermatozoides de un tipo cromosómico específico ha variado en sus tasas de éxito de acuerdo

con la técnica utilizada para esta separación, lo que conlleva al riesgo considerable de la obtención de un producto del sexo no deseado.

Katigback *et al*/proponen la clasificación de estas técnicas en base a cuatro propiedades de las células espermáticas: contenido de ADN, motilidad, presencia de antígenos específicos de superficie y potencial Z¹⁴.

1.1.2.1. *Método basado en el contenido cromosómico*

La principal diferencia entre espermatozoides “masculinos” y “femeninos” es el contenido cromosómico. El cromosoma X es más largo que el cromosoma Y¹⁵, por lo cual contiene una mayor cantidad de ADN; se ha demostrado que en la especie humana existe una diferencia aproximada del 2.8% entre el contenido de ADN entre espermatozoides X y Y¹⁶.

Esta diferencia permitió el desarrollo de una metodología de separación de espermatozoides mediante citometría de flujo¹⁷. Para la cuantificación del ADN, se emplea el fluoróforo Hoechst 33342, lo que permite su separación de acuerdo con el contenido de ADN correspondiente al espermatozoide portador del cromosoma X o Y¹⁸.

Sin embargo, la interacción del fluoróforo con las células espermáticas y la posterior exposición a luz ultravioleta se consideran factores potencialmente mutagénicos, lo que ha limitado su aplicación clínica. En un estudio realizado por Karabinus *et al*¹⁹, se reporta una tasa de gestación entre 14-30%; el conjunto de estos factores ha determinado que esta metodología no reciba aprobación por la

Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA) para su aplicación en humanos.

1.1.2.2. *Métodos basados en la motilidad y densidad*

La diferencia en la cantidad de contenido de ADN se ha asociado directamente con las propiedades de peso, motilidad y densidad. En la motilidad, los espermatozoides portadores de un cromosoma Y al presentar una menor masa, presentan una mayor velocidad que los espermatozoides portadores de un cromosoma X, lo cual se ha demostrado mediante modelos matemáticos²⁰ y experimentación in vitro²¹⁻²⁵, pero aún sigue siendo tema de debate^{14,26,27}. Además, los espermatozoides X presentan un mayor tamaño y longitud Y, con lo que presentan una mayor velocidad de sedimentación en un medio de alta densidad.

Varios investigadores han utilizado diferentes métodos para evaluar la selección del sexo en función de la motilidad y densidad de los espermatozoides; sin embargo, la eficacia de estos métodos es discutible. La aplicación de metodologías sencillas utilizadas de manera rutinaria para la separación de los espermatozoides del plasma seminal se ha propuesto como metodología para la selección de sexo preconcepcional. Esto ha permitido el desarrollo de técnicas sencillas que no se alejan de los procedimientos convencionales^{28,29}: centrifugación de gradientes de densidad (DGC, por sus siglas en inglés *Density Gradient Centrifugation*), swim-up convencional (CSW, por sus siglas en inglés

Conventional Swim-Up) y swim-up directo (DSW, por sus siglas en inglés *Direct Swim-Up*).

El objetivo de las mismas es producir una preparación final que contenga un alto porcentaje de células morfológicamente normales y móviles, libres de contaminantes, células no germinales y espermatozoides muertos, para su utilización en metodología de IIU y FIV³⁰.

En la metodología de DGC, se prepara un medio discontinuo, utilizando varias capas de gradientes de densidad variable, actualmente basados en una suspensión coloidal de partículas de sílice recubiertas y estabilizadas con silano hidrofílico unido covalentemente; una muestra de líquida seminal sobrepuesta sobre los gradientes es centrifugada, permitiendo la separación del plasma seminal y de las células por su densidad²⁹ (Figura 1). Los espermatozoides portadores del cromosoma X, al presentar una mayor velocidad de sedimentación, migran primero hacia el fondo del tubo, esperando un mayor enriquecimiento de esta población en el botón celular^{31,32}.

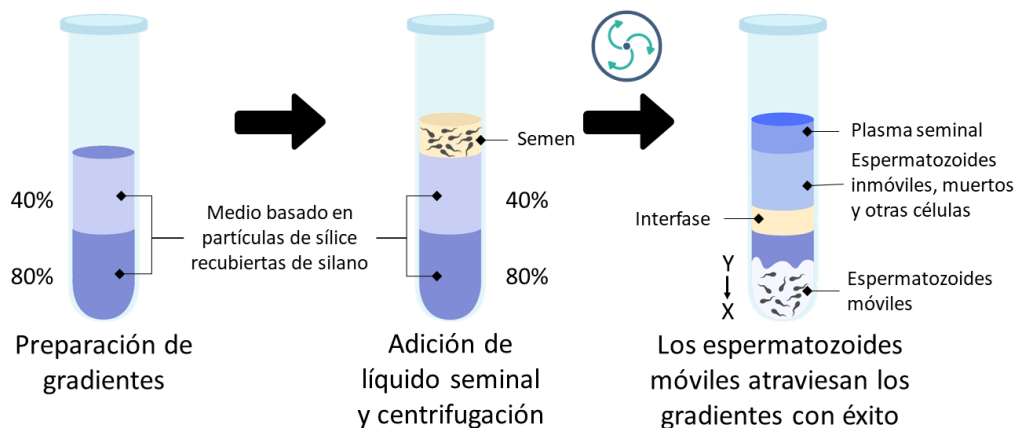


Figura 1. Método de Centrifugación en Gradientes de Densidad

En la metodología de swim-up, un medio de cultivo de alta densidad suplementado con albumina es colocado sobre la muestra de líquido seminal, y los espermatozoides móviles migran a través del cultivo^{29,30} (Figura 2). Los espermatozoides en la región más alejada del sedimento tienen mayor probabilidad de ser móviles progresivos y morfológicamente normales. Al presentar una mayor motilidad, es esperado que los espermatozoides portadores del cromosoma Y migren en mayor cantidad a esta región.

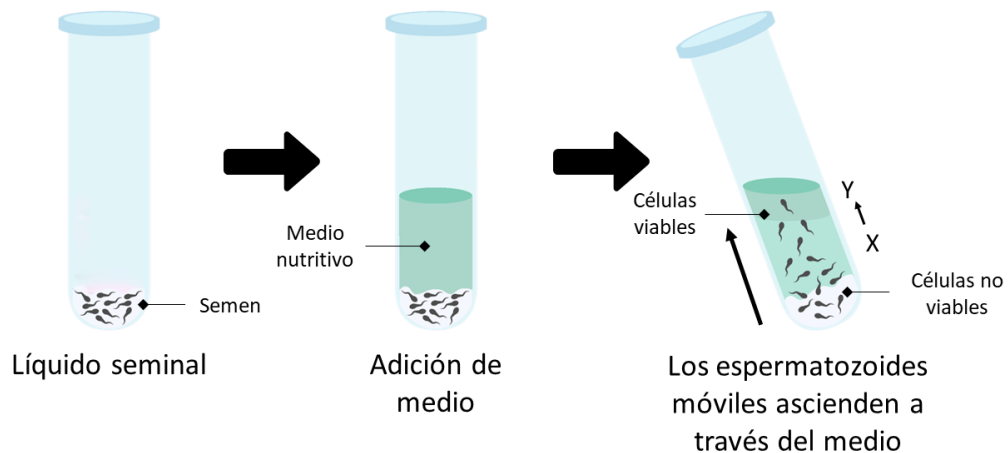


Figura 2. Método de Swim-Up

El método de DSU es una modificación del método de CSU, que surgió para el procesamiento de muestras que presentan una baja concentración espermática (oligozoospermia), omitiendo un paso de centrifugación previo a la adición de medio sobre el botón celular, utilizando la muestra de líquido seminal completa en el método de DSU²⁸. Esta modificación ha presentado un nivel más bajo de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) que incluyen radicales hidroxilo (OH), aniones

superóxido (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), alterando la integridad del ADN espermático.

Diversas modificaciones al método convencional de DSU han sido exploradas para potenciar la separación de los espermatozoides en base a su portación de un cromosoma X y Y, analizando la eficacia obtenida mediante la alteración de factores como la naturaleza del medio, las condiciones de incubación, el tiempo de procesamiento³³, y mediante la adición de procesamiento a la muestra antes y después del swim-up.

Se ha reportado la influencia en esta separación mediante la utilización de una pipeta lineal para incrementar la longitud de migración de los espermatozoides^{24,25}, la alteración de los niveles de pH en el medio³⁴, el incremento de la temperatura de incubación, la exposición a ROS en concentraciones moderadas³⁵, la pre-incubación del líquido seminal mediante agentes que alteran la motilidad del espermatozoide vía señalización celular^{36,37}, y la adición de pasos de centrifugación posteriores para la separación diferencial de los espermatozoides en base su peso³⁸.

Ericsson *et al* proponen un método inverso de nado en descenso de los espermatozoides “swim-down”, a través de un sistema discontinuo de gradientes de albumina sérica bovina en el medio, que permita la separación de los espermatozoides de manera similar al esperado en el método de DGC^{21,23}. A lo largo de los años, esta metodología ha pasado a la aplicación clínica, generando resultados discordantes en los resultados obtenidos mediante el sexado de las

fracciones^{21,23,39,40}, el sexado de los embriones obtenidos⁴¹⁻⁴³ y la determinación del sexo del recién nacido en los embarazos exitosos⁴⁴⁻⁴⁶.

1.1.2.2. *Métodos basados en otras características espermáticas*

Otras diferencias que se han encontrado han sido tema de estudio constante, sin lograr establecer una metodología eficiente de separación para su aplicación clínica. Se ha teorizado la presencia de marcadores celulares específicos de sexo expresados en la superficie, entre los que destacan aquellos de la familia de proteínas H-Y, permitiendo un enfoque inmunológico en la separación^{14,47}. Por otro lado, ante la influencia de un campo eléctrico se ha observado una migración más veloz de espermatozoides X respecto a los espermatozoides Y⁴⁸.

Actualmente, este enfoque inmunológico y electroforético no ha conseguido trasladarse a la aplicación clínica en humanos, debido principalmente a su complejidad técnica, su alto costo, y su actual estatus de desarrollo pausado; en contraste con las metodologías convencionales basadas en las características de contenido de ADN, motilidad y sedimentación.

1.2. Métodos de evaluación

Las técnicas de selección de sexo, al tener como objetivo final un producto de concepción, comparten criterios de valoración importantes, entre los que destacan la tasa de fertilización y la tasa de gestación². Estas dos tasas indican

el porcentaje de cigotos o embarazos clínicos respectivamente, obtenidos en un ciclo de FIV o IIU (sólo tasa de gestación en este caso) realizado mediante las fracciones capacitadas.

Las técnicas de separación de espermatozoides valoran además la tasa de recuperación de espermatozoides en las fracciones obtenidas para determinar su eficacia en el objetivo de separación, dando especial importancia a los espermatozoides móviles morfológicamente normales³⁰; sin embargo, la tasa de recuperación puede ser valorada en base con diversos parámetros seminales y características espermáticas.

Otro criterio que considerar en las técnicas de separación de espermatozoides es el índice de daño al ADN. El daño al ADN se ha correlacionado fuertemente con una alteración en la función espermática, por lo cual es considerado importante en la determinación de la calidad el semen en las ART; se ha demostrado que índices de fragmentación del ADN arriba del 30% se asocian fuertemente con una baja tasa de gestación tanto en la concepción natural como artificial mediante ART⁴⁹. Aunado a esto, la carencia de mecanismos de reparación en las células del líquido seminal imposibilita la reparación del daño obtenido.

Este daño puede ser causado a diversos factores inherentes al líquido seminal y las células espermáticas (contenido de protaminas, deficiencias en la recombinación, estrés oxidativo), así como a factores extrínsecos, como la exposición a ROS y otros agentes tóxicos, temperaturas elevadas, alteración del pH, tiempo después de la eyaculación, infecciones o la reacción a

medicamentos^{28,49,50}. Se considera que la formación de aductos oxidativos conduce a la fragmentación del ADN espermático (SDF, por sus siglas en inglés *Sperm DNA Fragmentation*) y la muerte celular.

Un elemento importante en las técnicas de separación son los pasos de centrifugación, los cuales, además de disminuir las tasas de recuperación y generar daño de manera intrínseca, promueven la exposición de los espermatozoides a células inflamatorias y células espermatogénicas inmaduras que producen ROS, lo cual conduce a un mayor daño al ADN en los espermatozoides^{49,50}. La naturaleza del medio también se ha demostrado que afecta la integridad del ADN espermático, así como la motilidad y viabilidad de los espermatozoides⁵¹.

El índice de fragmentación de ADN (DFI, por sus siglas en inglés *DNA Fragmentation Index*) espermático nos indica el porcentaje de espermatozoides que presentan material genético no íntegro en la fracción final. Este índice puede ser determinado mediante diversas pruebas que han sido ampliamente estudiadas, como el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA, por sus siglas en inglés *Sperm Chromatin Structure Assay*), el ensayo TUNEL, el ensayo de cometa, la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado de celda única, la detección de rotura de ADN mediante FISH y la prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD, por sus siglas en inglés *Sperm Chromatine Dispersion*)⁴⁹.

Además de todos estos criterios de evaluación, en los métodos de selección de sexo preconcepcional es fundamental la evaluación de la eficacia

de las técnicas mediante la determinación de las proporciones obtenidas de espermatozoides portadores del cromosoma X y portadores del cromosoma Y, mediante el sexado de las fracciones obtenidas en estos procedimientos. De acuerdo con el objetivo de enriquecer las fracciones con un grupo específico de espermatozoides, podemos denominar este criterio como pureza.

Debido a las diferencias en el contenido de ADN entre los espermatozoides portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y en humanos, es que la pureza puede ser determinada indirectamente mediante técnicas de PCR (siendo utilizada principalmente la técnica de qPCR), de manera directa mediante el tamizaje de las células con la técnica de citometría de flujo (la cual contabiliza las células en base a la cantidad de ADN presente en su núcleo) o la contabilización directa de los espermatozoides identificados después de su marcaje directo mediante técnicas de amplificación *in situ* e hibridación genómica (siendo principalmente utilizado FISH)⁵².

1.3. Antecedentes

Diversos autores han reportado diferencias significativas en las proporciones de espermatozoides portadores de cada cromosoma mediante fracciones obtenidas en técnicas modificadas de swim-up; sin embargo, no todas las propuestas han sido aplicadas para el procesamiento de muestras de líquido seminal humano, y han de ser optimizadas debido a su alteración en la motilidad

de los espermatozoides, así como el propiciamiento de factores extrínsecos de daño al ADN.

Las técnicas convencionales de capacitación espermática han sido ampliamente estandarizadas³⁰, ayudando a obtener altas tasas de gestación al ser utilizadas en las ART (>90%) entre los diversos centros de reproducción asistida², además de ofrecer la ventaja de ser aplicadas de manera rutinaria los diversos laboratorios, ofreciendo una mayor asequibilidad y seguridad, así como un menor costo, complejidad y tiempo de procesamiento en comparación con técnicas de PGS y separación de espermatozoides mediante citometría de flujo^{6,11,14,38}.

La producción de daño mediante estas metodologías se relaciona principalmente con las condiciones de manipulación y tratamiento de las muestras; sin embargo, se ha demostrado que estas técnicas proporcionan un ambiente favorable para la separación de espermatozoides con la cromatina intacta, reduciendo el índice de SFD en las fracciones procesadas^{53,54}. Así mismo, las tasas de recuperación más altas reportadas mediante la técnica de DSU en comparación con la técnica de CSU, así como un menor índice de SFD⁵⁴, relacionado con la omisión del paso inicial de centrifugación²⁸, hacen favorable la utilización del primero para su aplicación en la separación de espermatozoides.

Se han obtenido resultados discordantes respecto a la pureza obtenida en las fracciones resultado de las técnicas de DSU y CSU^{20,24,25,32,33,55}. Uno de los estudios más recientes cuyos resultados se inclinan a favor de la separación efectiva de los espermatozoides en base al cromosoma que portan, realizado por

Azizzeddin *et al*²⁴, reportan un enriquecimiento diferencial mediante la evaluación de las fracciones con el uso de qPCR, observando mayor señal de amplificación (expresión relativa) para el cromosoma Y en una fracción obtenida de la capa superior, y para el cromosoma X en una fracción obtenida de la capa media inferior (sin alterar la región del sedimento).

Koundourous *et al*⁸⁸, proponen una metodología consistente en una modificación del método de CSU, que agrega una serie de pasos de centrifugación, para la separación diferencial en base al peso, esperando que los espermatozoides X migren hacia la capa inferior, se obtenga un enriquecimiento de espermatozoides Y en la capa superior. Ellos reportan, tras una evaluación de FISH, el incremento del porcentaje de espermatozoides Y en la fracción superior después de varias rondas de centrifugación.

Esta modificación aporta valor debido a su baja complejidad y alta accesibilidad entre los laboratorios clínicos convencionales y de reproducción asistida, sin el requerimiento de equipo costoso, o la modificación del medio de incubación y los insumos utilizados en las técnicas convencionales de capacitación espermática; por lo que es importante evaluar su eficacia en la obtención de parámetros seminales óptimos y la pureza de las fracciones. Además, es necesario revisar la posible adición de una fracción enriquecida en espermatozoides portadores del cromosoma X, estableciendo una nueva modificación propuesta para su utilización en la selección del sexo femenino en las ART.

La técnica de GDC surgió con el uso de gradientes de Percoll; diversos estudios reportaron de igual manera que en las otras técnicas convencionales, resultados discordantes en cuanto a la separación efectiva de espermatozoides en base a su cromosoma sexual portador^{31,41,56,57}. Sin embargo, el medio Percoll se retiró del mercado para su uso en muestras humanas para FIV en 1996 debido al riesgo de contaminación con endotoxinas.

Esmailpour *et al*² evalúan un método de gradientes de densidad discontinuo de 2 fases utilizando un medio comercial PureSperm. Para ello realizan una metodología de FISH de regiones específicas del cromosoma X y Y, contabilizando las proporciones de espermatozoides de cada cromosoma, reportando una proporción ligeramente mayor (4.40%) de espermatozoides portadores del cromosoma X en la fracción obtenida. Sin embargo, no reportan una diferencia significativa en este valor, ni consideran fracciones tomadas de diversos niveles de la región inferior del tubo, que podrían variar en las proporciones obtenidas debido a la naturaleza de la motilidad y velocidad de sedimentación diferencial entre los espermatozoides con el cromosoma X y con el cromosoma Y. Valorar esta modificación, y su afectación en los parámetros seminales, es necesario para poder realizar un análisis comparativo completo entre las técnicas convencionales de capacitación espermática.

La utilización previa de técnicas basadas en la PCR para evaluar la eficacia de estas técnicas hace viable el uso del gen de la amelogenina como alternativa para la estimación de proporciones sexuales en muestras de

espermatozoides en suspensión, basado en el contenido genético presente correspondiente a un cromosoma X o un cromosoma Y.

La amelogenina es una proteína presente en el esmalte dental, el gen codificante en el humano se encuentra en los cromosomas sexuales, presentando variaciones en la secuencia del gen localizado en el cromosoma X (región Xp22.1-Xp22.3, denominado *AMELX*) y el localizado en el cromosoma Y (región Yp 11.2, denominado *AMELY*). Sin embargo, la homología de regiones específicas permite el análisis simultáneo de ambos alelos mediante técnicas de PCR, lo cual se ha utilizado ampliamente para la identificación del sexo en humanos^{58,59}.

Este estudio, asociado al análisis de los amplicones obtenidos mediante electroforesis capilar, nos permite obtener niveles de expresión de cada alelo del gen expresados como unidades relativas de fluorescencia, lo cual se correlaciona indirectamente con la expresión de cada cromosoma sexual en la muestra, y esto con el porcentaje de espermatozoides portadores correspondientes en la fracción (pureza de las fracciones).

1.4. Justificación

La separación eficaz de los espermatozoides con cromosomas X e Y ha sido un tema de atención en la reproducción asistida. Los enfoques se han basado típicamente en las características cinéticas o físicas de los espermatozoides.

Gran parte de la información disponible hasta la fecha ha sugerido pruebas contradictorias entre diferentes enfoques o una falta de repetibilidad, mientras que otras técnicas robustas y reproducibles requieren equipos costosos y están siendo cuestionadas en relación con su seguridad en aplicaciones clínicas.

La accesibilidad de los laboratorios a técnicas sencillas, seguras, de corto tiempo de realización y bajo costo, que permitan la obtención de fracciones enriquecidas con espermatozoides de un cromosoma específico y aumenten la probabilidad de concepción de un producto del sexo deseado, hace necesario establecer cuál metodología entre las más accesibles es la más eficiente hasta el momento.

1.5. Objetivo general

Comparar tres técnicas de separación de espermatozoides portadores del cromosoma X de los portadores del cromosoma Y

1.6. Objetivos específicos

1. Determinar parámetros seminales y tasas de recuperación de espermatozoides en las fracciones obtenidas.
2. Analizar la fragmentación de ADN de las fracciones obtenidas.
3. Evaluar pureza de las fracciones procesadas en espermatozoides portadores de un cromosoma específico.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estrategia General

Con el fin de cumplir con los objetivos específicos, se seleccionaron 5 individuos hombres sanos quienes voluntariamente donaron una muestra de líquido seminal; la cual fue fraccionada para su uso en la evaluación de diversas técnicas de separación de espermatozoides que tienen como objetivo obtener fracciones enriquecidas en espermatozoides portadores de un cromosoma específico. El volumen total fue fraccionado en un grupo control (sin el procesamiento de separación de espermatozoides) y tres grupos experimentales (Figura 3). Cada fracción enriquecida obtenida en los grupos de procesamiento, así como las fracciones del grupo control fueron evaluadas y comparadas para los parámetros de motilidad, vitalidad, morfología y concentración de espermatozoides mediante un estudio seminológico; la fragmentación del ADN mediante la prueba de dispersión de la cromatina y el porcentaje de enriquecimiento de las fracciones mediante el análisis de la electroforesis capilar realizada posterior a la amplificación del gen de la amelogenina.

Se utilizaron muestras de donadores independientes para limitar el sesgo otorgado por el donador en el análisis comparativo de las técnicas.

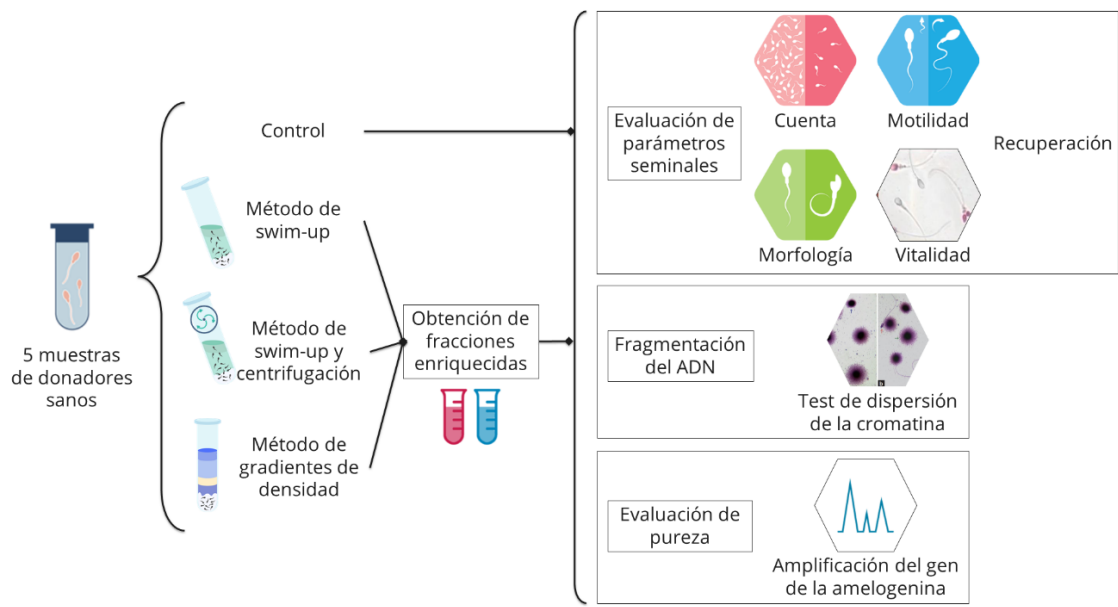


Figura 3. Estrategia general. Se muestran las principales etapas del proyecto de investigación en orden cronológico de izquierda a derecha.

2.2. Selección de donadores

Se seleccionaron 5 donadores masculinos sanos, entre 18 y 30 años, sin diagnóstico previo de enfermedades infecciosas del sistema urinario, enfermedades de transmisión sexual, alteración reproductiva o alguna patología relacionada al aparato reproductor o al líquido seminal. Los donadores fueron citados en una clínica especializada (Centro de Atención Médica + Laboratorio Clínico y de Fertilidad GÉNESIS, con dirección Avenida Terranova 240, Colonia Vista Hermosa, C. P. 64620, Monterrey, N. L., México) con un mínimo de 3 días de abstinencia sexual.

Para este propósito, se obtuvo una muestra de líquido seminal de cada donador, por masturbación en un frasco estéril. Las muestras fueron evaluadas para determinar su inclusión en el estudio mediante la realización de un

seminograma de acuerdo con los protocolos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Apéndice A). Previo al procesamiento, la muestra se incubó a 37 °C durante su periodo de licuefacción, el cual no debió ser mayor de 20 minutos.

Para el análisis macroscópico, se evaluaron los parámetros de volumen, tiempo de licuefacción, aspecto, color, viscosidad y pH. Para el análisis microscópico general se evaluará la presencia de moco, aglutinación espermática, agregación espermática, células redondas, eritrocitos y bacterias por campo.

Para la valoración de la motilidad espermática, se realizó un fresco de líquido seminal y se examinó de manera sistemática al menos 5 campos bajo microscopía de campo claro a 400 aumentos para evaluar un mínimo de 200 espermatozoides. La motilidad se calificó como “móvil progresiva” (MP) cuando se observe una velocidad del espermatozoide rápida y lineal, “móvil no progresiva” (NP) cuando se observe un movimiento curvo o lento e “inmóvil” (INM) cuando los espermatozoides no se muevan en absoluto.

Para la valoración de la vitalidad, se utilizó un método de exclusión del colorante eosina amarillenta (eosina Y), basada en la integridad de membrana de las células, observando que las membranas plasmáticas dañadas, como las que se encuentran en las células no vitales (muertas), permiten la entrada de colorantes impermeables a la membrana. Las preparaciones se observaron bajo un microscopio de campo claro a 400 aumentos y se categorizaron 200 espermatozoides por muestra, obteniendo un porcentaje de células espermáticas vivas.

Para la valoración de la concentración espermática, se utilizó una cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) de 10 μm de profundidad, y se contabilizaron los espermatozoides presentes en 100 cuadros de la cámara (0.01 $\text{mm}^2/\text{cuadro}$), para ser multiplicados por un factor de 105; con lo cual se obtuvo el valor de espermatozoides por mililitro.

Para la valoración de la morfología espermática, se preparó un extendido de las muestras, el cual fue fijado mediante etanol y teñido mediante la técnica de Papanicolaou. Las preparaciones se observaron bajo inmersión en un microscopio de campo claro a 1000 aumentos y se categorizaron 200 espermatozoides por muestra en formas normales y anormales, con base en los criterios de Kruger (establecidos por la OMS). Además, se evaluó la presencia de células inflamatorias y células espermatogénicas por cada 100 espermatozoides.

Para la selección de las muestras utilizadas en el estudio, se tomaron en cuenta los valores umbral establecidos por la OMS para los parámetros de volumen (≥ 1.5 mL), motilidad ($\geq 40\%$ de espermatozoides móviles, $\geq 32\%$ de espermatozoides progresivos móviles), vitalidad ($\geq 58\%$ de espermatozoides vivos), morfología ($\geq 4\%$ de formas espermáticas normales) y concentración de espermatozoides ($\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides por mL)³⁰.

2.3. Obtención de fracciones enriquecidas

Se obtuvo una segunda, tercera y cuarta muestra de líquido seminal de los donadores seleccionados en días separados, bajo las mismas condiciones que la primera toma de muestra. Previo al procesamiento, la muestra se incubó

a 37 °C durante su periodo de licuefacción, el cual no debió ser mayor de 20 minutos.

Posterior al tiempo de licuefacción, se obtuvo una alícuota de 200 µL de la muestra, la cual fue utilizada como muestra del grupo control. El volumen restante fue fraccionado en 3 partes iguales mediante una micropipeta, y el volumen utilizado fue registrado para posteriores cálculos. Las fracciones fueron transferidas por separado a un tubo nuevo acorde a la técnica de separación a realizar; el desarrollo de cada técnica se describe a continuación:

- *Técnica de swim-up directo (DSU):* La fracción de muestra de líquido seminal fue transferida al fondo de un tubo cónico estéril de 15 mL, y se colocó cuidadosamente por las paredes una capa superior de 1.2 mL de medio DMEM/HAM's F-12, HEPES (Gibco™, ThermoFisher Scientific) suplementado con Albúmina Sérica Humana (ASH) (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich). El tubo se inclinó a un ángulo de 45 °C para incrementar el área de superficie de la interfase, y se incubó por 1 hora a 37 °C en una incubadora³⁰. Posterior al tiempo de incubación, se regresó el tubo a su posición vertical, y se recuperaron mediante movimientos concéntricos de una micropipeta fracciones hipotéticamente enriquecidas en una población específica de espermatozoides, las cuales fueron transferidas a tubos nuevos independientes. Para la recuperación de la fracción enriquecida en espermatozoides Y (fracción Y) se tomaron 900 µL de la región superior (capa superior) y para la recuperación de la fracción enriquecida en

espermatozoides X (fracción X) se tomaron 300 μ L de la región subsecuente (capa media)²⁵. Ambas fracciones se centrifugaron a 300 g por 5 minutos, se desechó el sobrenadante, y se resuspendió el botón celular en 500 μ L del medio suplementado (Figura 4).

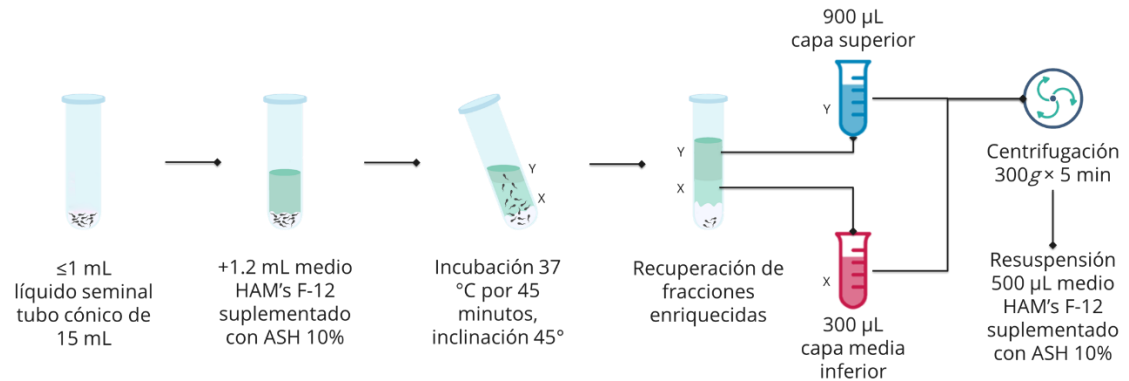


Figura 4. Técnica de Swim-Up Directo

- *Técnica de swim-up y centrifugación (SUC):* La fracción de muestra de líquido seminal fue transferida a un tubo cónico estéril de 15 mL, diluida en un volumen equitativo de medio DMEM/HAM's F-12, HEPES, y centrifugada a 300 g por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 500 μ L de medio, y se colocó cuidadosamente por las paredes una capa superior de 0.8 mL de medio suplementado con ASH (10 mg/mL). El tubo se inclinó a un ángulo de 45 °C para incrementar el área de superficie de la interfase, y se incubó por 1 hora a 37 °C en una incubadora³⁰. Posterior al tiempo de incubación, se regresó el tubo a su posición vertical, y se recuperaron mediante una micropipeta una fracción superior de 500 μ L y una fracción media

subsecuente de 300 μ L, las cuales serán transferidas a tubos nuevos independientes.

La fracción superior pasó por una serie de tres rondas de centrifugación sucesivas³⁸. Las dos primeras rondas se realizaron a 227 g por 3 min cada una, y la tercera ronda a 300 g por 5 min. En la primera ronda, la fracción superior se mezcló con 6 mL del medio e inmediatamente después de completar la centrifugación, se tomaron los 2 mL superiores del sobrenadante, los cuales se mezclaron con otros 5 mL de medio. Para la recuperación de la fracción enriquecida en espermatozoides Y (fracción Y), después de completar la segunda ronda de centrifugación se tomaron los 2 mL superiores del sobrenadante y se mezclaron con 1 mL de medio. Después de la ronda de centrifugación final, se desechó el sobrenadante, y se resuspendió el botón celular en 500 μ L del medio suplementado.

Para la recuperación de la fracción enriquecida en espermatozoides X (fracción X), se tomaron los 2 mL inferiores del sobrenadante y el botón celular después de la primera y segunda ronda de centrifugación, y se mezclaron con la fracción media del volumen de swim-up. La mezcla pasó por una ronda de centrifugación a 300 g por 5 minutos, se desechó el sobrenadante, y se resuspendió el botón celular en 500 μ L del medio suplementado (Figura 5).

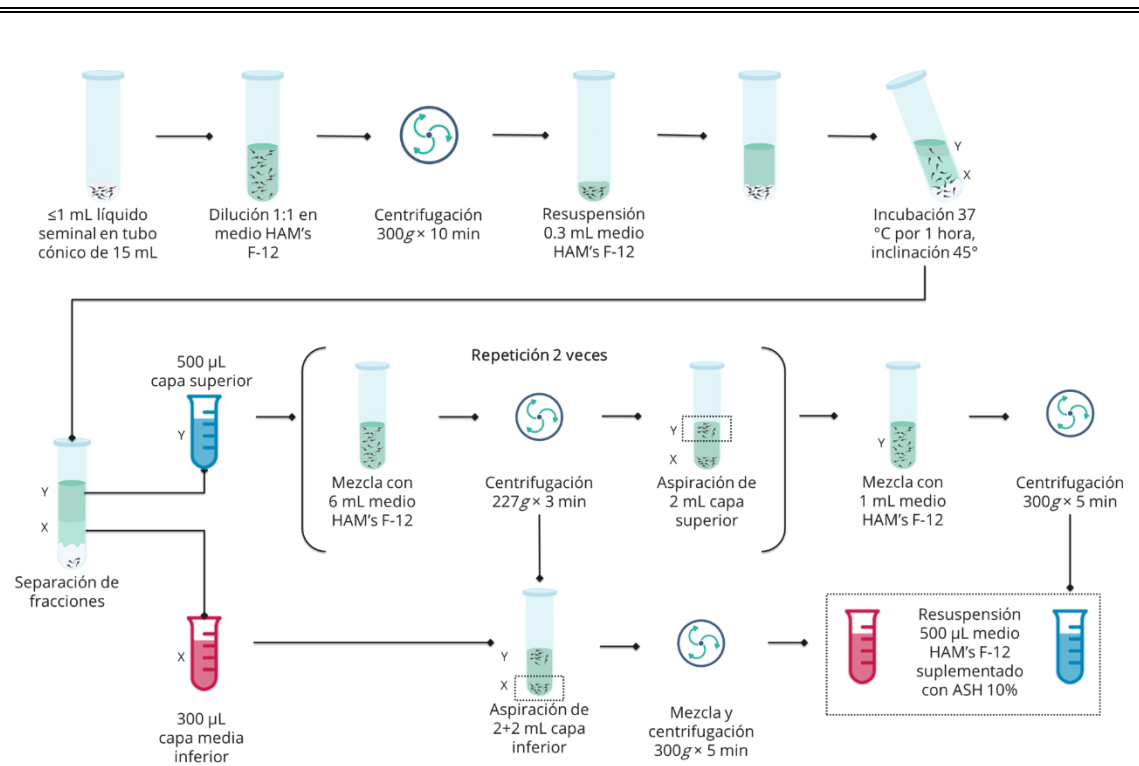


Figura 5. Técnica de Swim-Up y Centrifugación

- *Técnica de gradientes de densidad (DGC):* Se preparó inicialmente un sistema de gradientes de densidad discontinuos de 2 fases, una inferior de densidad 80% y una superior de densidad 40% con medio PureSperm® (Nidacon) diluido en medio DMEM/HAM's F-12, HEPES. Se colocó la muestra de líquido seminal en la región superior, y se centrifugó a $300g$ por 20 minutos³². El sistema generó una fracción superior de plasma seminal; dos fracciones medias ricas en células inmaduras, células muertas, espermatozoides inmóviles y leucocitos; y una fracción inferior de espermatozoides móviles. Para la recuperación de la fracción enriquecida en espermatozoides Y (fracción Y) se tomaron alrededor de 300 μL de la región superior de la fracción inferior y

para la recuperación de la fracción enriquecida en espermatozoides X (fracción X) se tomaron 200 μ L de la región inferior de la fracción inferior, así como el botón celular. Ambas fracciones se mezclaron con 5 mL de medio DMEM/HAM's F-12, HEPES, y se centrifugaron a 300 *g* por 5 minutos; se desechó el sobrenadante, y se resuspendió el botón celular en 500 μ L del medio suplementado con ASH (10 mg/mL) (Figura 6).

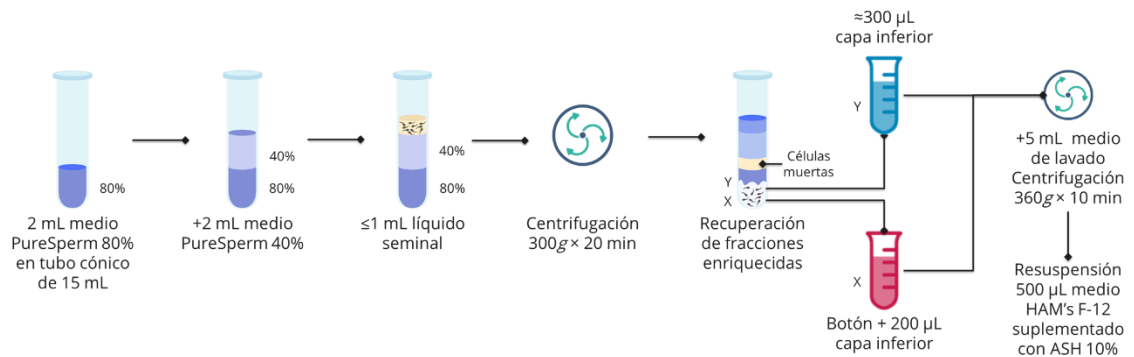


Figura 6. Técnica de Gradientes de Densidad

2.4. Evaluación de fracciones procesadas

2.4.1. Determinación de los parámetros seminales en las fracciones procesadas

Las muestras del grupo control y las fracciones obtenidas enriquecidas en espermatozoides X y Y fueron utilizadas para la valoración de los parámetros de motilidad, vitalidad, morfología y concentración de espermatozoides. Estas valoraciones se efectuaron de igual manera a las determinaciones descritas para la selección de muestras (Apéndice A).

Se estimaron las tasas de recuperación de espermatozoides en base a las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} & \text{Tasa de recuperación de espermatozoides progresivos móviles (\%)} \\ & = \frac{(\text{concentración} \times \text{spz MP} \times \text{volumen}) \text{ post-selección}}{(\text{concentración} \times \text{spz MP} \times \text{volumen}) \text{ pre-selección}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Tasa de recuperación de espermatozoides vivos (\%)} \\ & = \frac{(\text{concentración} \times \text{spz vivos} \times \text{volumen}) \text{ post-selección}}{(\text{concentración} \times \text{spz vivos} \times \text{volumen}) \text{ pre-selección}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Tasa de recuperación de espermatozoides morfológicamente normales (\%)} \\ & = \frac{(\text{concentración} \times \text{spz MNo} \times \text{volumen}) \text{ post-selección}}{(\text{concentración} \times \text{spz MNo} \times \text{volumen}) \text{ pre-selección}} \times 100 \end{aligned}$$

considerando:

- concentración: concentración de espermatozoides por mL ($\times 10^6/\text{mL}$)
- spz MNo: espermatozoides morfológicamente normales expresado en porcentaje (%)
- spz MP: espermatozoides móviles progresivos expresado en porcentaje (%)
- spz vivos: espermatozoides vivos expresado en porcentaje (%)
- volumen post-selección: volumen de la fracción enriquecida (mL)
- volumen pre-selección: volumen utilizado para la técnica (mL)

2.4.2. Determinación de la fragmentación de ADN en las fracciones procesadas mediante la prueba de SCD

La determinación de la fragmentación de ADN se realizará en las muestras del grupo control y las fracciones obtenidas enriquecidas en espermatozoides X y Y mediante el la prueba de SCD descrita por Fernández *et al*^{60,61}, el cual se basa en el principio de que los espermatozoides con ADN fragmentado no producen el halo característico de los bucles de ADN dispersos que se observa en los espermatozoides con ADN no fragmentado, después de la desnaturalización ácida y la eliminación de proteínas nucleares.

Para esto se prepararán portaobjetos recubiertos de agarosa, sobre los cuales se agregará una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión y cada una de las fracciones, y se dejará solidificar a baja temperatura para su posterior pase por diversas soluciones de desnaturalización, neutralización, lisis y desproteinización de las células espermáticas (Apéndice B). Las preparaciones se teñirán mediante un protocolo de Wright, y se clasificarán 200 espermatozoides observados de cada fracción en 5 grupos (Figura 7). Los espermatozoides que presenten halos grandes o medianos de dispersión se considerarán espermatozoides sin fragmentación del ADN, mientras que los espermatozoides que presenten halos pequeños de dispersión, ausencia de halos de dispersión o nucleoides degradados, se considerarán espermatozoides con fragmentación del ADN. Se estimará un índice de fragmentación del ADN (DFI), representando el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN en cada fracción.

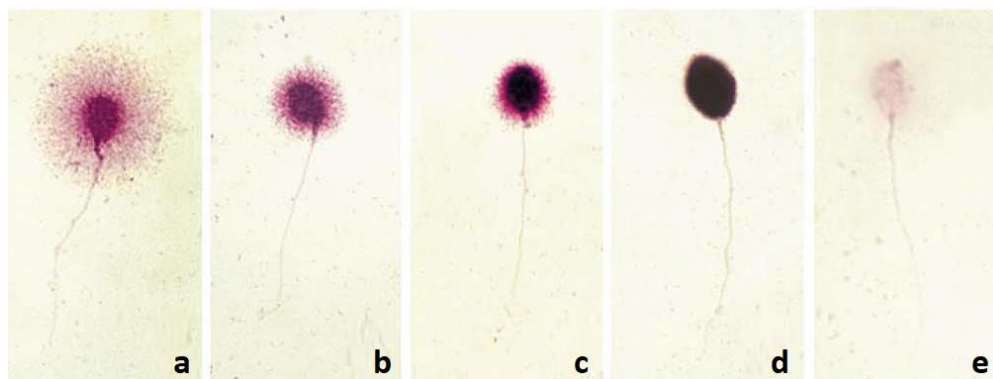


Figura 7. Nucleoides de espermatozoides humanos obtenidos con el procedimiento de SCD y teñidos mediante Wright. Se muestran micrografías representativas de las diversas variaciones obtenidas mediante el método, presentando halos grandes (a), halos medianos (b) o halos pequeños de dispersión (c), ausencia de halos de dispersión (d), con o sin presencia de nucleoides degradados (e). (Fernández et al., 2005⁶¹)

2.4.3. Determinación de la pureza de las fracciones procesadas

El sexado se realizó en las muestras del grupo control y las fracciones obtenidas hipotética enriquecidas en espermatozoides portadores del cromosoma X y Y mediante el análisis de la electroforesis capilar realizada posterior a la amplificación del gen de la amelogenina.

Para ello, las fracciones procesadas, así como las fracciones control, con un volumen final de 200 μ L, pasaron por un procedimiento de extracción orgánica fenol-cloroformo (Apéndice C) mediante el estuche comercial DNA IQ™ System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) y el sistema de filtración, purificación y concentración Amicon® Ultra 0.5 (Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, USA), de acuerdo con las recomendaciones del manual de usuario del proveedor.

Posteriormente, se procedió a la cuantificación en las muestras de ADN mediante el estuche comercial Quantifiler™ Trio DNA Quantification (Applied

Biosystems™, Waltham, Massachusetts, USA), que utiliza un procedimiento estandarizado de qPCR (Apéndice D), de acuerdo con las recomendaciones del manual de usuario del proveedor.

Para la amplificación del gen de la amelogenina, se utilizó el estuche comercial GlobalFiler PCR Amplification (Applied Biosystems™), de acuerdo con las recomendaciones del manual de usuario del proveedor (Apéndice E), que permite la obtención de un perfil genético mediante la amplificación de loci autosómicos presentes en regiones microsatélite (STR, por su acrónimo en inglés para *Short Tandem Repeat*), así como en el gen de amelogenina, que actúa como un marcador determinante de sexo^{58,59}.

Las diferencias entre la secuencia del gen de la amelogenina presente en el cromosoma X (*AMELX*) y el presente en el cromosoma Y (*AMELY*), debidas a sustituciones puntuales de nucleótidos, e inserciones nucleotídicas diferenciales en ambos alelos, además de la homologación completa de regiones específicas del gen⁵⁸, permite la amplificación simultánea de ambos alelos sexuales mediante la utilización de un par único de cebadores, y la discriminación selectiva de los mismos mediante la generación de amplicones de diverso tamaño⁵⁹.

El sistema comercial integra un sistema de etiquetado de los cebadores mediante fluoróforos, para su detección mediante un sistema de electroforesis capilar. Para el análisis de los amplicones por electroforesis capilar se realizó una dilución de cada producto de amplificación de la siguiente manera: 1 µL de muestra, 8 µL de formamida y 0.3 µL del estándar de tamaño GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0 (Applied Biosystems™), que permite la medición del

tamaño de los amplicones obtenidos en el equipo de electroforesis capilar mediante la alineación del tiempo de detección de los fragmentos del estándar.

Para la obtención de los electroferogramas, se utilizó el programa GeneMapper™ ID-X Software v1.4 acoplado al equipo 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems™). Las señales de amplificación para el gen de la amelogenina se obtuvieron como picos de amplificación aislados para los alelos AMELX y AMELY; el valor devuelto de la altura de los picos por el programa, representando un nivel de amplificación de cada alelo en la muestra y expresado como unidades relativas de fluorescencia (RFU, por sus siglas en inglés *Relative Fluorescence Units*), se utilizó para el cálculo de proporciones en el contenido genético de cada alelo en las fracciones analizadas de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} & \text{Proporción de contenido genético del cromosoma X (\%)} \\ & = \frac{\text{RFU del alelo AMELX}}{\text{RFU del alelo AMELX} + \text{RFU del alelo AMELY}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Proporción de contenido genético del cromosoma Y (\%)} \\ & = \frac{\text{RFU del alelo AMELY}}{\text{RFU del alelo AMELX} + \text{RFU del alelo AMELY}} \times 100 \end{aligned}$$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Comparación de parámetros seminales en las fracciones procesadas

Se obtuvieron y procesaron 15 muestras de líquido seminal (3 por cada donador) con las técnicas a comparar (DSU, SUC y DGC). Se recuperó una alícuota inicial como grupo control, que se utilizó en esta técnica para valorar los parámetros seminales previo al procesamiento, y poder determinar las tasas de recuperación de espermatozoides con los parámetros seminales óptimos de motilidad, vitalidad y morfología (Tasa de recuperación de espermatozoides progresivos móviles (%), espermatozoides vivos (%) y espermatozoides morfológicamente normales (%), respectivamente).

En la figura 8, se muestran micrografías representativas de las variantes morfológicas observadas en las muestras control mediante la técnica de Papanicolaou. Las características de un espermatozoide morfológicamente normal se describen a detalle en el apéndice A.

Las fracciones procesadas obtuvieron una mayor tasa de recuperación en el parámetro de morfología con respecto a los parámetros de motilidad y vitalidad (Figura 9). Al realizar la comparación entre las fracciones procesadas, se observó

una mayor tasa de recuperación de espermatozoides de la fracción X de la técnica de DGC en comparación con su contraparte, la fracción Y de la misma técnica, así como con las fracciones X de las técnicas de DSU y SUC, para los parámetros de motilidad, vitalidad y morfología.

Así mismo, la recuperación total de espermatozoides en la fracción Y de la técnica de SUC fue muy baja, confirmando diferencias significativas en las tasas de recuperación con respecto a otras fracciones en los parámetros de motilidad y vitalidad, e imposibilitando la identificación y contabilización de células en la extensión de las fracciones para la valoración de la morfología (Figura 9).

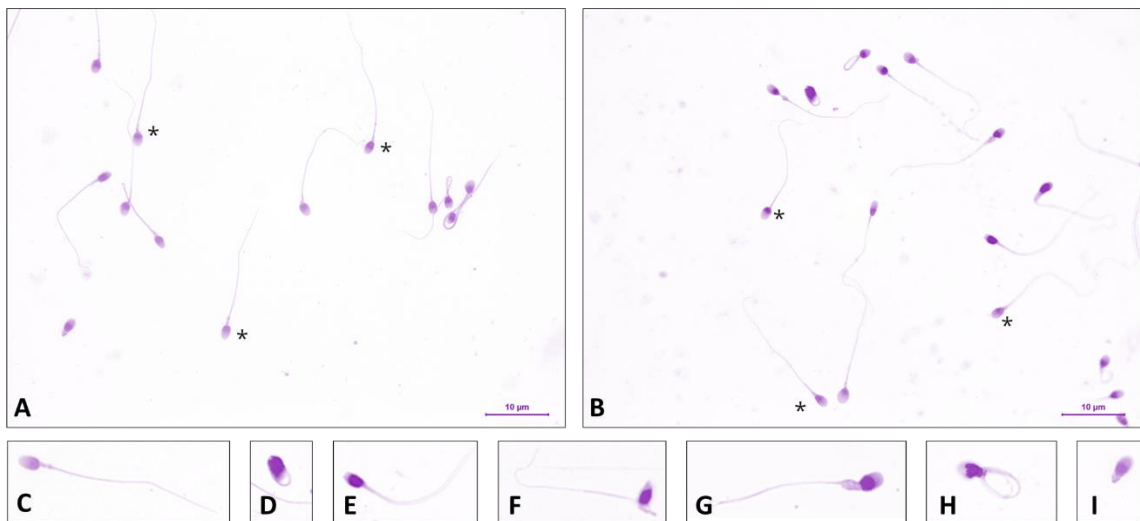


Figura 8. Morfología observada en los espermatozoides mediante la técnica de Papanicolaou. Se muestran micrografías representativas de los campos observados (A y B) en las muestras de líquido seminal procesadas mediante la técnica de Papanicolaou (400 aumentos), y aumentos selectivos de las mismas (C-I) que muestran la morfología normal del espermatozoide (C), así como alteraciones a nivel de cabeza (D y E), pieza media del flagelo (F y G) y pieza principal del flagelo (H e I). Los asteriscos en los campos A y B representan los espermatozoides con morfología normal.

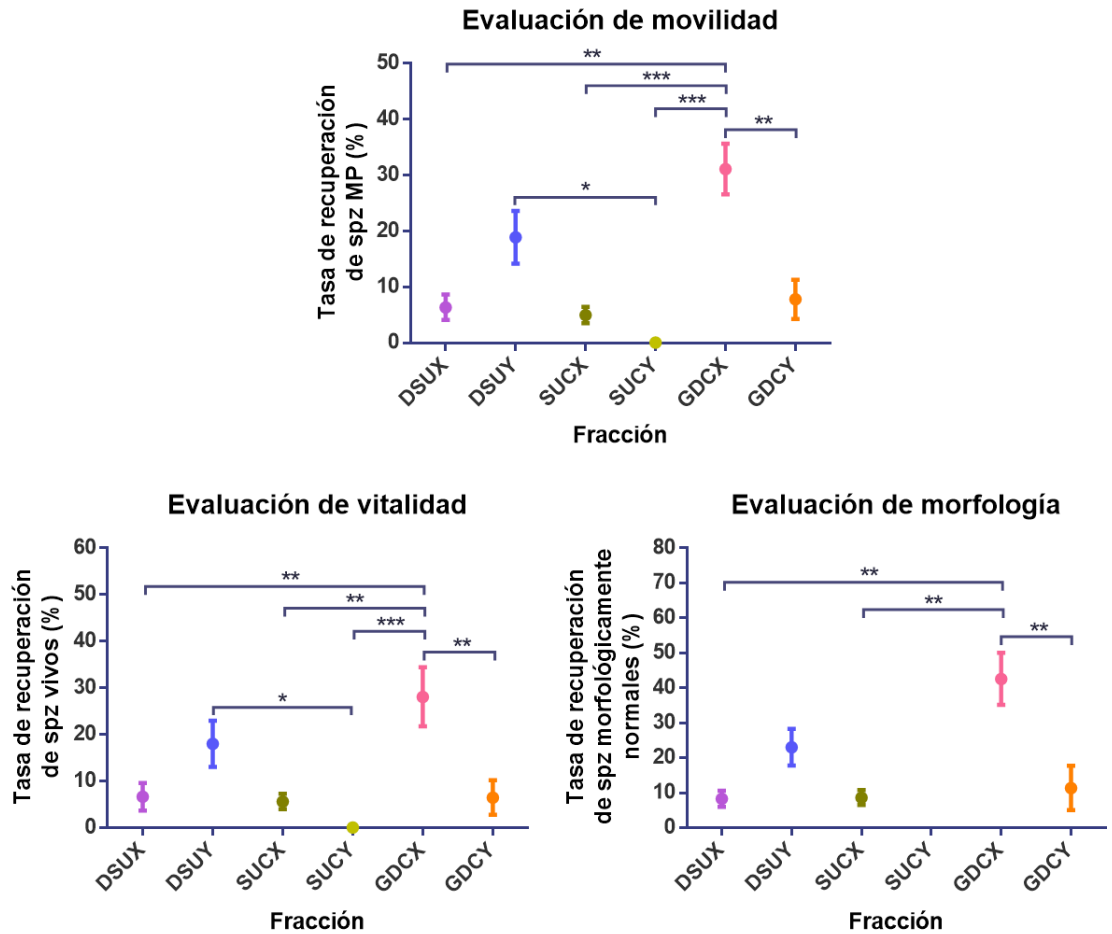


Figura 9. Tasas de recuperación de espermatozoides óptimos para los parámetros de motilidad, vitalidad y morfología. DSUX: Swim-up directo, fracción X; DSUY: Swim-up directo, fracción Y; SUCX: Swim-up y centrifugación, fracción X; SUCY: Swim-up y centrifugación, fracción Y; GDCX: Gradientes de densidad, fracción X; GDCY: Gradientes de densidad, fracción Y. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ANOVA, $n = 15$.

3.2. Comparación del DFI espermático en las fracciones procesadas

Para la valoración del daño al ADN, se evaluaron las fracciones obtenidas de 5 muestras de líquido seminal (1 por cada donador). La baja recuperación total de espermatozoides en la fracción Y de la técnica de SUC imposibilitó la evaluación del SFD en la misma. En la figura 10, se visualizan campos

representativos que reflejan las diferencias observadas en los halos de dispersión espermáticos. Se visualizó una predominancia de halos de dispersión grandes en la fracción X de la técnica GDC en comparación al resto, abundancia de halos de dispersión medianos en las fracciones X y Y de la técnica DSU y la fracción X de la técnica GDC, lo cual se relacionó directamente con menores valores de DFI (Figura 11). La abundancia de nucleoides sin halo de dispersión en la fracción X de la técnica SUC se relacionó de igual manera con un mayor DFI en comparación con el grupo control y el resto de las fracciones.

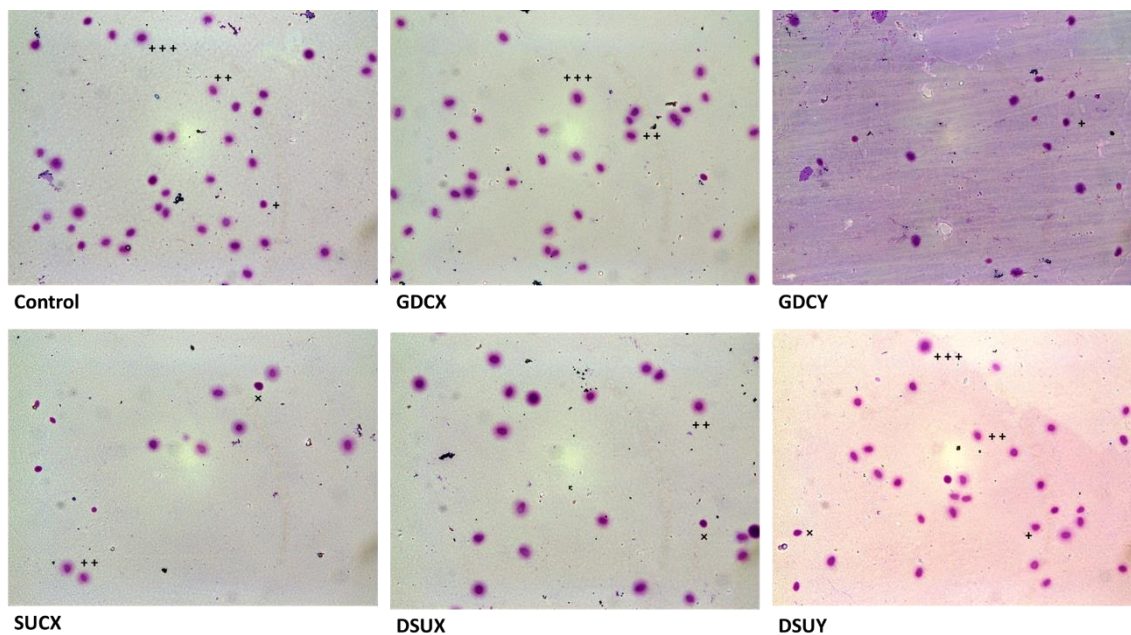


Figura 10. Micrografías representativas del daño al ADN observado en las fracciones procesadas, mediante la prueba de SCD. Los halos de dispersión alrededor del nucleoide se señalan de manera representativa para cada fracción enriquecida y para las fracciones control de la siguiente manera: halos de dispersión grandes (+++), halos de dispersión medianos (++) , halos de dispersión chicos (+), nucleoides sin halos de dispersión (x).400 aumentos.

Al realizar la comparación del índice de fragmentación obtenido en las fracciones procesadas con las fracciones previo al procesamiento, se observó

una disminución significativa de los espermatozoides con daño en la fracción Y de la técnica DSU y en la fracción X de la técnica GDC (Figura 11). Así mismo, se observó un aumento significativo de la SDF en la fracción X de la técnica de SUC, indicando la inducción de daño por el procesamiento.

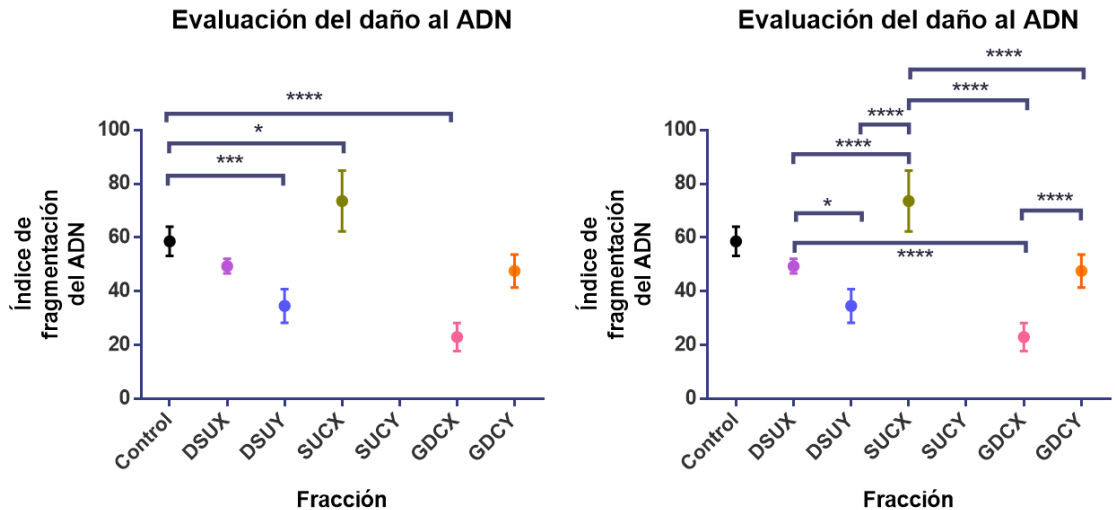


Figura 11. Alteración de los FDI en las fracciones procesadas. DSUX: Swim-up directo, fracción X; DSUY: Swim-up directo, fracción Y; SUCX: Swim-up y centrifugación, fracción X; SUCY: Swim-up y centrifugación, fracción Y; GDCX: Gradientes de densidad, fracción X; GDCY: Gradientes de densidad, fracción Y. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$, ANOVA, $n = 5$.

El análisis comparativo entre fracciones no proporcionó diferencias significativas entre las fracciones que presentaron una disminución significativa del FDI en comparación a la muestra pre-procesamiento.

3.3. Comparación de las proporciones sexuales de contenido genético en las fracciones procesadas

Para evaluar la pureza de las fracciones obtenidas y determinar si se logró un enriquecimiento en las mismas, se recurrió a la amplificación del gen de la

amelogenina, y el análisis mediante electroforesis capilar; se evaluaron las fracciones obtenidas de 5 muestras de líquido seminal (1 por cada donador). El cálculo de proporciones sexuales se realizó con los niveles de amplificación relativa (RFU) de cada alelo sexual del gen, devueltos por la señal del marcador fluorescente utilizado en la amplificación (Figura 12).

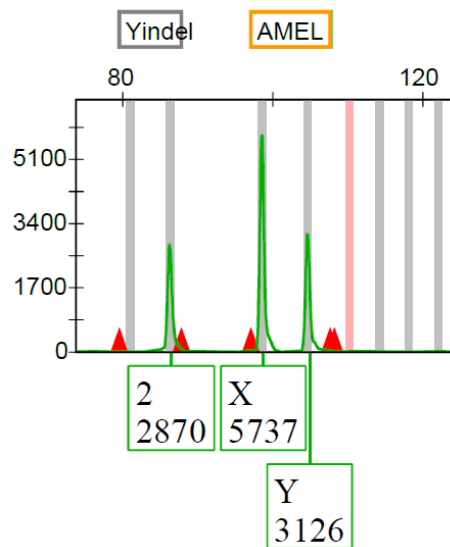


Figura 12. Electroferograma de la amplificación del gen de la amelogenina. Diagrama representativo devuelto por el programa GeneMapper™ ID-X Software v1.4 de la electroforesis capilar de los productos de amplificación del gen de la amelogenina (picos de color verde X y Y). En el eje vertical se presentan las RFU, de igual manera que debajo de cada pico señalando su altura, en el eje horizontal se presenta el tiempo de detección del amplicón en la corrida y las barras grises representan la señal de detección de los fragmentos del estándar de tamaño.

La proporción sexual X:Y obtenida en los grupos control estuvo cercana a 1:1 (porcentaje cercano a 50% para el contenido genético del cromosoma X y del cromosoma Y). Ninguna de las fracciones presentó una diferencia significativa entre la proporción sexual del grupo pre-procesamiento y los valores de pureza, representados como la proporción genética del cromosoma X y Y (%) para las fracciones X y Y respectivamente (Figura 13).

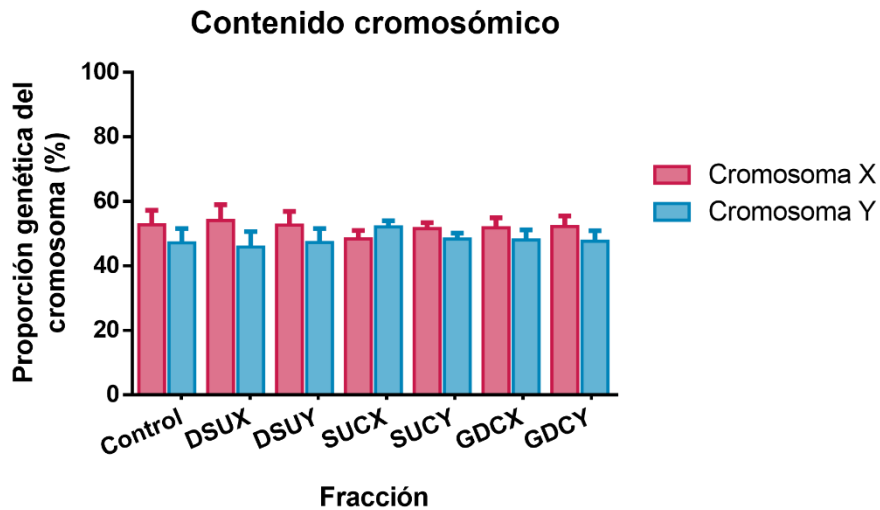


Figura 13. Falta de enriquecimiento en las fracciones procesadas. DSUX: Swim-up directo, fracción X; DSUY: Swim-up directo, fracción Y; SUCX: Swim-up y centrifugación, fracción X; SUCY: Swim-up y centrifugación, fracción Y; GDCX: Gradientes de densidad, fracción X; GDCY: Gradientes de densidad, fracción Y. *: $p \leq 0.05$, ANOVA, $n = 5$.

3.4. Comparación de las proporciones sexuales de contenido genético en las fracciones procesadas

En la tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en las evaluaciones descritas anteriormente, donde se exponen los valores de cada grupo como medias con desviaciones estándar.

Tabla 2

Parámetros seminales, integridad del ADN y pureza de las fracciones obtenidas de espermatozoides

Parámetro / grupo	Control	DSUX	DSUY	SUCX	SUCY	GDCX	GDCY
Motilidad progresiva (%)	55.20±9.58	69.80±17.47	68.80±9.81	37.00±12.73	61.80±11.05	45.00±14.25	68.40±18.65
Tasa de recuperación de spz MP (%)	N/A	6.37±5.10	18.90±10.54	4.97±3.26	0.07±0.01	31.09±10.17	7.79±7.92
Vitalidad (%)	81.00±13.10	85.60±15.40	75.70±12.15	61.00±23.48	79.20±2.59	70.00±27.72	87.20±6.65
Tasa de recuperación de spz vivos (%)	N/A	6.66±6.66	18.00±11.07	5.63±3.76	0.06±0.01	28.09±14.16	6.49±8.34
Formas normales de spz (%)	44.60±3.65	74.40±4.39	66.60±6.11	51.20±8.44	N/A	50.00±10.49	66.00±3.39
Tasa de recuperación de spz MNo (%)	N/A	8.28±5.25	23.07±11.65	8.66±4.78	N/A	42.58±16.60	11.39±3.24
FDI (%)	68.60±5.41	49.40±2.70	34.60±6.27	73.60±11.33	N/A	23.00±5.24	47.60±6.11
Proporción sexual de X* (%)	52.83±4.46	54.14±4.86	52.68±4.27	48.48±2.54	51.66±1.83	51.84±3.08	52.29±3.21
Proporción sexual de Y** (%)	47.17±4.46	45.86±4.86	47.32±4.27	51.52±2.54	48.32±1.83	48.16±3.08	47.71±3.21

spz = espermatozoides; MP = móviles progresivos; MNo = morfológicamente normales; FDI: Índice de Fragmentación del ADN; N/A = No Aplica

* La proporción sexual de X representa la proporción genética del cromosoma X, y la pureza para para las fracciones DSUX, SUCX y GDCX.

* La proporción sexual de Y representa la proporción genética del cromosoma Y, y la pureza para para las fracciones DSUY, SUCY y GDCY.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La evolución de las ART ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías para la concepción de un producto género-específico. Se han abordado diversos enfoques para cumplir este objetivo, tomando particular interés la selección de sexo preconcepcional debido a su baja “invasividad”¹¹.

Criterios como la asequibilidad, el costo, la seguridad, la complejidad y el tiempo de procesamiento de las técnicas; así como la influencia de daño en el contenido genético con que se asocian, les confieren ventaja a las técnicas de capacitación espermática convencionales sobre metodologías nuevas¹⁴.

Por este motivo, se ha evaluado la influencia que tienen las técnicas convencionales de capacitación en el enriquecimiento de fracciones en espermatozoides portadores de un cromosoma X o Y, y en la obtención de células viables con características ideales de motilidad, vitalidad, morfología e integridad del ADN.

Al realizar el análisis de los parámetros seminales en las fracciones obtenidas mediante las técnicas a evaluar, se observó una mayor eficiencia en la técnica de gradientes de densidad para la obtención de espermatozoides viables, concordante a lo reportado en la literatura^{29,62,63}. Las muestras de líquido seminal con concentraciones altas de espermatozoides están asociadas con una baja

recuperación en el método de DSU, efectivo en muestras oligozoospermicas⁶⁴, lo que podría estar influyendo en las tasas de recuperación más bajas en la técnica de DSU en comparación a la técnica de GDC. Esta última técnica, sin embargo, se ha reportado ser efectiva independientemente de la concentración espermática⁶³. La adición de la separación de fracciones de manera diferente a la reportada en los protocolos subyacentes en la literatura, con el fin de evaluar el posible enriquecimiento diferencial de estas fracciones de acuerdo con la separación de los espermatozoides por sus características intrínsecas, no aportó ninguna mejoría significativa en la recuperación de espermatozoides viables, y en cambio, se observó una disminución de la calidad de parámetros seminales observados en estas fracciones (Figura 9, fracciones DSUX y GDCY).

En la comparación de los valores de FDI obtenidos mediante la técnica de SCD para evaluar el porcentaje de daño genético (SDF) presente entre las células de fracciones observamos una reducción del daño mediante ambas técnicas convencionales de capacitación. Se observó una diferencia significativa entre el FDI de la técnica de DSU y GDC, siendo mayor en esta última en concordancia con reportes previos^{53,54,62}; esto puede relacionarse a la utilización de tiempos prolongados de centrifugación y temperaturas de incubación no idóneas en la técnica de GDC para la separación de las células, los cuales promueven el daño de manera intrínseca^{49,50}, sin embargo, la separación efectiva de células inflamatorias y espermátogénicas reduce el daño extrínseco dado por la exposición a ROS y otros agentes inductores de daño al ADN^{28,63}.

La combinación de ambas técnicas convencionales de capacitación se ha propuesta para mejorar los parámetros de motilidad, vitalidad y morfología en las fracciones finales, así como disminuir el índice de espermatozoides que presentan daño al ADN^{53,54,62}; sin embargo, esta opción no es posible utilizarla con el propósito de generar fracciones enriquecidas para la selección de sexo, por lo cual no fue contemplada en el presente estudio. También se han establecido diferencias en los parámetros seminales y la integridad del ADN en base a la calidad del medio de incubación y capacitación utilizado tanto para la técnica de DSU^{51,65} como para la técnica de GDC⁶⁶.

En la literatura existe un reporte más amplio de la utilización de la técnica de swim-up con el propósito de la selección de sexo, en comparación con un sistema de gradientes de densidad. Nuestro estudio proporciona más evidencia con respecto a la eficacia que tienen las técnicas convencionales en producir fracciones enriquecidas en espermatozoides portadores de un cromosoma sexual específico, para el favorecimiento posterior de la obtención de un producto del sexo deseado mediante las ART, no revisado en este estudio. Por el lado de la técnica de DSU, se han observado resultados concordantes con los reportes no favorables para el enriquecimiento selectivo de fracciones^{33,67}; esta objetivo tampoco se logró en la técnica de GDC, confirmando un reporte adicional al único existente que valora la técnica mediante la utilización del medio recomendado con partículas de sílice recubiertas de silano³². La disponibilidad de técnicas de evaluación más directas para los métodos de selección de sexo preconcepcional, como PCR *in situ* y FISH, hace necesario validar los resultados encontrados

mediante estas técnicas para comprobar la utilidad de procedimientos de PCR y datos relativos devueltos por programas informáticos para valorar la eficacia de la separación de espermatozoides *in vitro*.

Por otro lado, no se logró replicar los resultados reportados de la técnica modificada de swim-up utilizado ciclos de centrifugación adicionales (SUC)³⁸. Las tasas de recuperación fueron significativamente bajas, lo que imposibilitó la valoración de parámetros como la morfología espermática y la SDF. Aunado a esto, la fracción propuesta para la recuperación de espermatozoides portadores del cromosoma X (SUCX) presentó un aumento significativo en el DFI de los espermatozoides presentes en comparación con las fracciones previo al procesamiento, ligado al daño propiciado por los pasos repetitivos de centrifugación y la inefectiva separación de elementos celulares productores de agentes de daño revisados previamente, como ROS. No se logró obtener un enriquecimiento de espermatozoides portadores del cromosoma Y en la fracción estipulada por el protocolo propuesto por el autor.

En los últimos años siguen surgiendo técnicas que contemplan la modificación de diversos factores en la metodología de swim-up directo para favorecer la migración diferencial de los espermatozoides; los cuales han surgido principalmente en la industria ganadera en reemplazo de técnicas más complejas y costosas (como la aplicación de citometría de flujo, revisada previamente, utilizada ampliamente en ese ámbito). La mayor parte de estas técnicas aún no han sido trasladados y evaluados para su aplicación en muestras humanas, lo

que hace necesaria su consideración en futuros estudios como parte de las TRA enfocadas en la selección de sexo preconcepcional.

Azizzeddin *et al* han propuesto una técnica de swim-up modificado con un sistema de mayor longitud y menor anchura (como el uso de pipetas) que los tubos utilizados de manera convencional en el procesamiento de la técnica²⁴; para retar la habilidad de nado de los espermatozoides y favorecer la migración diferencial hipotética que presentan los espermatozoides, que no ha podido comprobarse en el presente estudio mediante las técnicas convencionales. La técnica se aplicó inicialmente en toros, y posteriormente fue replicada en búfalos²⁵.

Además, se ha reportado que la motilidad de los espermatozoides X e Y varía en determinadas condiciones *in vitro*. Por ejemplo, la exposición de pH bajo, temperaturas altas y la influencia de estrés oxidativo retrasaron la motilidad en los espermatozoides Y en muestras de líquido seminal humano, mientras que la motilidad de los espermatozoides X disminuyó rápidamente cuando los espermatozoides se incubaron en condiciones de pH básico³⁵, sin embargo, estas condiciones se consideran altamente agresivas para las células espermáticas, por lo que representan poca aplicabilidad clínica. Resultados contradictorios en las condiciones de pH se han reportado mediante la utilización de soluciones amortiguadores en valores de pH en el rango de 5.5-9.0 para el procedimiento de swim-up en muestras bovinas, con los cuales no se logró obtener diferencias significativas en la abundancia de espermatozoides portadores de cromosoma X o Y en las fracciones colectadas³⁴.

En un estudio reciente, Umehara *et al*⁶ reportaron que la activación del ligando de TLR7/8 disminuyó significativamente la motilidad de los espermatozoides X (al alterar la producción de ATP) al compararla con la motilidad de los espermatozoides Y; esto permitiría desarrollar y estandarizar una metodología más fiable para la separación de espermatozoides y la producción de fracciones enriquecidas en una población género-específica, utilizado para la producción eficiente de embriones de bovinos y ratones sexo-específico mediante ART³⁷.

La información obtenida hace necesario seguir evaluando modificaciones a la técnica de swim-up, debido a su sencillez y seguridad. Para ello, es necesario el traslado a la aplicación en muestras humanas de técnicas utilizadas exclusivamente en la industria ganadera con el objetivo de la selección de sexo preconcepcional. También es importante evaluar la eficacia de estas técnicas mediante el uso de metodologías más directas para el sexado de las fracciones enriquecidas, como paso inicial para el futuro traslado a la aplicación clínica mediante la utilización de las fracciones en técnicas de IIU, ICSI y FIV, así como la producción e implantación de embriones.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

El método de gradientes de densidad es el más eficiente para la recuperación de espermatozoides viables con características óptimas de motilidad, vitalidad y morfología.

El método de gradientes de densidad y el método de swim-up obtuvieron una mayor reducción en el porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN.

Ninguno de los tres métodos evaluados permitió el enriquecimiento de fracciones en espermatozoides portadores de un cromosoma específico; sin embargo, es necesario evaluar si nuevas modificaciones a las condiciones del método permiten una separación más efectiva.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kalfoglou, A. L., Kammersell, M., Philpott, S. & Dahl, E. Ethical arguments for and against sperm sorting for non-medical sex selection: a review. *Reprod. Biomed. Online* **26**, 231–239 (2013).
2. International Federation of Fertility Societies. International Federation of Fertility Societies' Surveillance (IFFS) 2019: Global Trends in Reproductive Policy and Practice, 8th Edition. *Glob. Reprod. Heal.* **4**, e29 (2019).
3. Darnovsky, M. *Countries with laws or policies on sex selection*. https://web.archive.org/web/20161009201212/http://geneticsandsociety.org/downloads/200904_sex_selection_memo.pdf (2009).
4. Center for Genetics and Society. Sex selection - BioPolicyWiki. http://www.biopolicywiki.org/index.php?title=Sex_selection.
5. Flores-Sánchez, I., Gutiérrez-Salinas, J. & Gaviño-Ambriz, S. La necesidad de la creación de una norma oficial mexicana sobre reproducción asistida. *Rev. Espec. Médico-Quirúrgicas* **12**, 8–12 (2007).
6. Dondorp, W. *et al.* ESHRE Task Force on ethics and Law 20: Sex selection for non-medical reasons. *Hum. Reprod.* **28**, 1448–1454 (2013).
7. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Use of reproductive technology for sex selection for nonmedical reasons. *Fertil. Steril.* **103**, 1418–1422 (2015).
8. Chambers, G. M., Adamson, G. D. & Eijkemans, M. J. C. Acceptable cost for the patient and society. *Fertil. Steril.* **100**, 319–327 (2013).
9. Jackson, E., Millbank, J., Karpin, I. & Stuhmcke, A. Learning from cross-border reproduction. *Med. Law Rev.* **25**, 23–46 (2017).
10. Rodrigo, L., Mercader, A. & Rubio, C. Cribado genético preimplantacional. in *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: Aspectos clínicos* (eds. Remohí Giménez, J. *et al.*) 604–614 (Medica Panamericana, 2017).
11. Cuevas, I., Llácer, J., Ten, J., Mendiola, J. & Bernabeu, R. Situación actual de la selección de sexo. *Rev. Iberoam. Fertil.* **19**, 337–343 (2002).
12. Harper, J. C. Preimplantation genetic screening. *J. Med. Screen.* **25**, 1–5 (2018).

-
13. Harper, J. C. Introduction to preimplantation genetic diagnosis. in *Preimplantation Genetic Diagnosis, Second Edition* (ed. Harper, J. C.) 1–47 (Cambridge University Press, 2009). doi:10.1017/CBO9780511581571.002.
 14. Katigbak, R. D., Turchini, G. M., Graaf, S. P. De, Kong, L. & Dumée, L. F. Review on Sperm Sorting Technologies and Sperm Properties toward New Separation Methods via the Interface of Biochemistry and Material Science. *Adv. Biosyst.* **3**, e1900079 (2019).
 15. Cui, K. & Matthews, C. D. X larger than Y. *Nature* **363**, 117–118 (1993).
 16. Cran, D. G. & Johnson, L. A. The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa. *Hum. Reprod. Update* **2**, 355–363 (1996).
 17. Johnson, L. A. *et al.* Preimplantation diagnosis: Gender preselection in humans? flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases. *Hum. Reprod.* **8**, 1733–1739 (1993).
 18. Garner, D. L. Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology* **71**, 11–21 (2009).
 19. Karabinus, D. S. *et al.* The effectiveness of flow cytometric sorting of human sperm (MicroSort®) for influencing a child's sex. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **12**, 106 (2014).
 20. Roberts, A. M. Gravitational Separation of X and Y Spermatozoa. *Nature* **238**, 223–225 (1972).
 21. Ericsson, R. J., Langevin, C. N. & Nishino, M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* **246**, 421–424 (1973).
 22. Check, J. H., Shanis, B. S., Cooper, S. O. & Bollendorf, A. Male sex preselection: Swim-up technique and insemination of women after ovulation induction. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **23**, 165–166 (1989).
 23. Beernink, F. J., Dmowski, W. P. & Ericsson, R. J. Sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertil. Steril.* **59**, 382–386 (1993).
 24. Azizeddin, A., Ashkar, F. A., King, W. A. & Revay, T. Enrichment of Y-chromosome-bearing bull spermatozoa by swim-up through a column. *Reprod. Domest. Anim.* **49**, 1–5 (2014).
 25. Asma-ul-Husna *et al.* Sperm sexing in Nili-Ravi buffalo through modified swim up: Validation using SYBR® green real-time PCR. *Anim. Reprod. Sci.* **182**, 69–76 (2017).
 26. Evans, J. M., Douglas, T. A. & Renton, J. P. An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. *Nature* **253**, 352–354 (1975).
 27. Rahman, M. S. & Pang, M. G. New Biological Insights on X and Y

-
- Chromosome-Bearing Spermatozoa. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 1–19 (2020).
28. Rappa, K. L. *et al.* Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnol. Adv.* **34**, 578–587 (2016).
 29. Beydola, T., Sharma, R. & Agarwal, A. Sperm Preparation and Selection Techniques. in *Medical and Surgical Management of Male Infertility* (eds. Rizk, R. B., Aziz, N., Agarwal, A. & Sabanegh, E.) 244–251 (Jaypee Brothers Medical Publishers, 2014). doi:10.5005/jp/books/11840_29.
 30. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed.* (2010).
 31. Iizuka, R., Kaneko, S., Aoki, R. & Kobayashi, T. Sexing of human sperm by discontinuous percoll density gradient and its clinical application. *Hum. Reprod.* **2**, 573–575 (1987).
 32. Esmaeilpour, T. *et al.* Effect of combined density gradient centrifugation on X- and Y- sperm separation and chromatin integrity. *Iran. J. Reprod. Med.* **10**, 435–440 (2012).
 33. Yan, J. *et al.* Influence of swim-up time on the ratio of X- and Y-bearing spermatozoa. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **129**, 150–154 (2006).
 34. Raval, N. P., Shah, T. M., George, L. B. & Joshi, C. G. Effect of the pH in the enrichment of X or Y sex chromosome-bearing sperm in bovine. *Vet. World* **12**, 1299–1303 (2019).
 35. Oyeyipo, I. P., van der Linde, M. & du Plessis, S. S. Environmental exposure of sperm sex-chromosomes: A gender selection technique. *Toxicol. Res.* **33**, 315–323 (2017).
 36. Umehara, T., Tsujita, N. & Shimada, M. Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm. *PLOS Biol.* **17**, e3000398 (2019).
 37. Umehara, T., Tsujita, N., Zhu, Z., Ikedo, M. & Shimada, M. A simple sperm-sexing method that activates TLR7/8 on X sperm for the efficient production of sexed mouse or cattle embryos. *Nat. Protoc.* **15**, 2645–2667 (2020).
 38. Koundouros, S. & Verma, P. Significant enrichment of Y-bearing chromosome human spermatozoa using a modified centrifugation technique. *Int. J. Androl.* **35**, 880–886 (2012).
 39. Ross, A., Robinson, J. A. & Evans, H. J. Failure to confirm separation of X- and Y-bearing human sperm using BSA gradients. *Nature* **253**, 354–355 (1975).
 40. Baheri, S., Saki, G., Mohamaddi, A. J. & Khodadadi, A. Assessment of the separation of X-and Y-chromosome bearing sperms of fertile men by albumin gradients using real time PCR. *Jentashapir J. Heal. Res.* **7**,
-

e31079 (2016).

41. Wolf, C. A. *et al.* The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Anim. Reprod.* **5**, 110–115 (2008).
42. Hadi, S. & AL-Timimi, I. H. Effect of Sperm Selection by "Swim-Up" Technique on the Sex Ratio of In Vitro Produced Ovine Embryos. *Iraqi J. Vet. Med.* **37**, 175–179 (2013).
43. Silverman, A. Y. *et al.* Female sex selection using clomiphene citrate and albumin separation of human sperm. *Hum. Reprod.* **17**, 1254–1256 (2002).
44. Al-Dujaily, S. S. & Al-Dahan, S. E. Gender Selection by Ericsson Method in Intrauterine Insemination for Infertile Couples. *Iraqi J. Med. Sci.* **12**, 25–30 (2014).
45. Ahmadi, S., Rahmani, E., Motamed, N. & Sadeghi, F. Investigating the success rate of sex selection in cycles of intrauterine insemination of sperm using an albumin gradient method in infertile couples referring to theomid persian gulf infertility center of bushehr, iran. *Int. J. Women's Heal. Reprod. Sci.* **5**, 107–111 (2017).
46. AL-Najjar, S. G. Albumin Gradient and Sex Selection in Couples with Normal Seminal Fluid Parameters. *Indian J. Public Heal. Res. Dev.* **10**, 1538–1543 (2019).
47. Yadav, S. K. *et al.* An immunological approach of sperm sexing and different methods for identification of X- and Y-chromosome bearing sperm. *Vet. World* **10**, 498–504 (2017).
48. Ishijima, S. A., Okuno, M. & Mohri, H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int. J. Androl.* **14**, 340–347 (1991).
49. González-Marín, C., Gosálvez, J. & Roy, R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 14026–14052 (2012).
50. Aitken, R. J., Bronson, R., Smith, T. B. & De Luliis, G. N. The source and significance of dna damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol. Hum. Reprod.* **19**, 475–485 (2013).
51. Anbari, F. & Khalili, M. A. The quality of sperm preparation medium affects the motility , viability , and DNA integrity of human spermatozoa. 254–258 (2016) doi:10.4103/0974-1208.197691.
52. Flaherty, S. P. & Matthews, C. D. Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 937–942 (1996).

-
53. Jayaraman, V., Upadhya, D., Narayan, P. K. & Adiga, S. K. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J. Assist. Reprod. Genet.* **29**, 557–563 (2012).
 54. Volpes, A. *et al.* The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *J. Assist. Reprod. Genet.* **33**, 765–770 (2016).
 55. Tie Lan Han, Flaherty, S. P., Ford, J. H. & Matthews, C. D. Detection of X- and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. *Fertil. Steril.* **60**, 1046–1051 (1993).
 56. Lin, S. P., Lee, R. K. K., Tsai, Y. J., Hwu, Y. M. & Lin, M. H. Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. *J. Assist. Reprod. Genet.* **15**, 565–569 (1998).
 57. Kobayashi, J. *et al.* Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. *J. Reprod. Dev.* **50**, 463–469 (2004).
 58. Francès, F., Castelló, A. & Verdú, F. El diagnóstico genético del sexo mediante el test de la amelogenina: Métodos y posibles fuentes de error. *Cuad. Med. Forense* **14**, 119–125 (2008).
 59. Velarde-Félix, J. S. *et al.* Identificación del sexo mediante análisis molecular del gen de la amelogenina Artemisa medigraphic en línea. *Rev Mex Patol Clin* **55**, 17–20 (2008).
 60. Fernández, J. L. *et al.* The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* **24**, 59–66 (2003).
 61. Fernández, J. L. *et al.* Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.* **84**, 833–842 (2005).
 62. Ghumman, S. *et al.* Combination of swim-up and density gradient separation methods effectively eliminate DNA damaged sperm. *J. Turkish Ger. Gynecol. Assoc.* **12**, 148–152 (2011).
 63. Henkel, R. R. & Schill, W. B. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 1–22 (2003).
 64. Adiga, S. K. & Kumar, P. Influence of swim-up method on the recovery of spermatozoa from different types of semen samples. *J. Assist. Reprod. Genet.* **18**, 160–164 (2001).
 65. Chiamchanya, C., Kaewnoonual, N., Visutakul, P., Manochantr, S. & Chaiya, J. Comparative study of the effects of three semen preparation media on semen analysis, DNA damage and protamine deficiency, and the correlation between DNA integrity and sperm parameters. *Asian J.*

Androl. **12**, 271–277 (2010).

66. Malvezzi, H., Sharma, R., Agarwal, A., Abuzenadah, A. M. & Abu-Elmagd, M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: A controlled trial. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **12**, 1–7 (2014).
67. De Jonge, C. J., Swann, N. J., Flaherty, S. P., Matthews, C. D. & Barnes, A. M. Failure of multitube sperm swim-up for sex preselection. *Fertil. Steril.* **67**, 1109–1114 (1997).

APÉNDICES

APÉNDICE A

Procedimiento de espermatobioscopia directa o seminograma

Material y equipo:

Preparación de soluciones

- Balanza analítica
- Frascos de vidrio con tapa
- Vaso o matraz de vidrio
- Probeta
- Embudo
- Papel filtro

Tinción de Papanicolaou

- Jarras Coplin
- Cubreobjetos 22x50
- Lápiz diamante

Procedimiento

- Incubadora
- Microscopio de campo claro
- Contabilizador de células
- Cámara Makler
- Tubo cónico 15 mL
- Pipeta Pasteur de vidrio
- Papel indicador de pH
- Micropipeta 10-100 µL
- Portaobjetos 25x75
- Cubreobjetos 22x22

Reactivos:

Preparación de soluciones

- Agua destilada
- Etanol
- PBS o solución fisiológica
- Rojo neutro
- Eosina Y

Microscopía

- Aceite de inmersión

Tinción de Papanicolaou

- Xileno
- Etanol
- Hematoxilina de Harris
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de amonio
- Papanicolaou OG-6
- Papanicolaou EA-50

Muestra

- Líquido seminal

Procedimiento

1. Encender la incubadora, y ajustar la temperatura a 37 °C.
2. Obtener la muestra mediante masturbación y eyaculación en un contenedor estéril de boca ancha.
3. Rotular el recipiente con el nombre del donante, fecha y hora de la recolección.

-
- Registrar si la muestra está incompleta, especialmente si se pudo haber perdido la primera fracción rica en espermatozoides.
4. Transferir inmediatamente el recipiente a la incubadora mientras la muestra se licúa, no más de 20 minutos. Introducir colorantes, portaobjetos, cubreobjetos y la cámara Makler en la incubadora.

Análisis físicoquímico

5. Determinar el **tiempo de licuefacción** observando la presencia de flóculos proteínicos en el eyaculado, la muestra licuada debe ser homogénea y de aspecto acuoso.
 - Las muestras normales de semen licuado pueden contener cuerpos gelatinosos que no se licuan.
6. Transferir muestra de líquido seminal a un tubo cónico graduado de 15 mL, y medir el **volumen de eyaculado**.
7. Determinar el **color** de la muestra, haciendo una descripción comparativa.
8. Determinar el **aspecto**, depositando dentro del tubo la punta de una pipeta Pasteur de vidrio, y observándolo frente a un área iluminada. Valorar en base a los siguientes criterios:
 - Translúcido. Se observa en su totalidad el tubo capilar desde el extremo del fondo del tubo cónico hasta la superficie del líquido seminal.
 - Semitranslúcido. Se observa el tubo capilar solo en la parte cónica del tubo.
 - Opaco. No se observa el tubo capilar en ninguna de las regiones del tubo.
9. Estimar **viscosidad** de la muestra aspirándola suavemente en una pipeta Pasteur de vidrio, y dejándola caer gota a gota. Valorar en base a los siguientes criterios:
 - Viscosidad disminuida. Formación de un hilo entre 0 y 0.5 cm de longitud
 - Viscosidad normal: Formación de un hilo entre 0.6 y 2.0 cm de longitud
 - Viscosidad aumentada: Formación de un hilo mayor de 2.0 cm de longitud
10. Mezclar bien la muestra (NO vórtex, sin crear burbujas), y realizar la medición de **pH**, mediante papel indicador en el rango de 6.0 a 10.0.

Análisis microscópico

11. Mezclar bien la muestra (NO vórtex, sin crear burbujas), y tomar una alícuota de 20 μ L mediante una micropipeta.
12. Colocar alícuota sobre un portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos 22x22, ambos previamente atemperados entre 20 y 37 °C.
13. Valorar homogeneidad y presencia de filamentos mucosos en la muestra.
 - Si el número de espermatozoides por campo varía considerablemente, la muestra no es homogénea. En este caso y excluyendo la presencia de agregación y aglutinación, repetir la alícuota.

-
14. Valorar la **concentración espermática aproximada** realizando la observación de 10 campos a 400 aumentos y en base a los siguientes criterios:
 - Baja: <20 espermatozoides por campo.
 - Regular: 20-60 espermatozoides por campo.
 - Buena: 60-100 espermatozoides por campo.
 - Muy buena: >100 espermatozoides por campo.
 15. Valorar la presencia de **células epiteliales escamosas**, **células redondas** y **cristales** realizando la observación de 10 campos a 400 aumentos y contabilizando el número de células o cristales (evaluar el tipo de cristales presentes) presentes por campo.
 - Se puede utilizar un colorante de contraste para su evaluación (p. ej.: una **solución de rojo neutro al 1.5% en PBS de pH 7.4 o solución fisiológica**).
 16. Evaluar la concentración de **detritus celulares** realizando la observación de 10 campos a 400 aumentos.
 - Se reportan como escasos, moderados o abundantes.
 17. Valorar la concentración de **eritrocitos** y **bacterias** (evaluando su forma [cocos, bacilos y/o pleomórficos] y agregación) realizando la observación de 10 campos a 400 aumentos y en base a los siguientes criterios:
 - Escasos: 1-3 células por campo
 - Moderados: 3-7 células por campo
 - Abundantes: >8 células por campo
 18. Determinar la presencia de **agregación de los espermatozoides**, y su especificidad (adherencia de espermatozoides inmóviles entre sí, o de espermatozoides móviles a filamentos mucosos, detritus celulares u otros tipos celulares).
 19. Determinar la presencia de **aglutinación espermática**, y valorar el mayor tipo de aglutinación presente para su reporte (cabeza-cabeza, cola-cola, punta de cola-punta de cola, combinada o cabeza-cola).
 20. Valorar la **motilidad espermática** de mínimo 200 espermatozoides mediante un contabilizar de células, realizando la observación a 400 aumentos en un área definida a mínimo 5 mm de distancia de la orilla del cubreobjetos, y escaneando mínimo 5 campos de una manera dinámica.
 - Realizar la evaluación por duplicado de ser necesario, mediante el replicado de la preparación en fresco (paso 11 y 12).
 - Empezar a escanear instantáneamente, y contar rápidamente. El objetivo es contar todos los espermatozoides móviles en el campo, evitando a los que entren dentro del campo durante la evaluación instantánea.
 - Valorar en base a los siguientes criterios:
 - Grado A (III): Motilidad progresiva rectilineal con velocidad de desplazamiento >25 $\mu\text{m/s}$ a 37°C.
-

-
- Grado B (II): Motilidad progresiva curvilínea con un movimiento no lineal del espermatozoide en su trayectoria a través del campo microscópico y una velocidad de desplazamiento entre 5 y 24 $\mu\text{m/s}$.
 - Grado C (I): Motilidad no progresiva, en espermatozoides con patrones de movimiento *in situ* (sin progresión), y cuya velocidad no rebasa los 5 $\mu\text{m/s}$.
 - Grado D (0): Espermatozoides no motiles (no presentan desplazamiento).
 - Contabilizar inicialmente los espermatozoides móviles progresivos (PR, grado A y B), seguido de los móviles no progresivos (NP, grado C) y finalmente los inmóviles (IM, grado D). Si la cuenta de 200 espermatozoides es obtenida antes de que todas las categorías hayan sido evaluadas, la cuenta continúa en toda el área definida para evaluar hasta que todas las categorías hayan sido valoradas en la misma.
 - Calcular el porcentaje promedio para cada grado de motilidad de ser necesario, reportando el número entero más próximo. Reportar de acuerdo a la valoración en grados A-D, y de acuerdo a la clasificación en motilidad progresiva (PR), motilidad no progresiva (NP) e inmovilidad (IM).
21. Mezclar bien la muestra (NO vórtex, sin crear burbujas), y tomar una alícuota de 10 μL mediante una micropipeta.
22. Colocar alícuota sobre un portaobjetos.
23. Tomar una alícuota de 10 μL de una solución de eosina Y al 1%, mediante una micropipeta, y colocar sobre la muestra (mezclar mediante movimientos circulares con una punta de pipeta).
- **Eosina Y al 1%: 1 g de eosina Y en 100 mL de PBS de pH 7.4 o solución fisiológica.**
24. Cubrir con un cubreobjetos 22×22 limpio, previamente atemperado entre 20 y 37 °C, y dejar reposar por 30 segundos.
25. Valorar la **vitalidad espermática** de mínimo 200 espermatozoides mediante un contabilizar de células, realizando la observación a 400 aumentos.
- Realizar la evaluación por duplicado de ser necesario, mediante el replicado de la preparación (paso 21 a 24).
 - Valorar en base a los siguientes criterios:
 - Vivos: Células desteñidas, espermatozoides con cabezas transparentes, blancas o rosa claro.
 - Muertos: Células teñidas, espermatozoides con cabezas rojas o rosa oscuro.
 - Calcular el porcentaje promedio para vitalidad espermática de ser necesario, reportando el número entero más próximo.
-

Cuenta espermática

26. Mezclar bien la muestra (NO vórtex, sin crear burbujas), y tomar una alícuota de 10 μ L mediante una micropipeta.
27. Colocar alícuota en el centro de la base de la cámara Makler (en el medio del círculo).
28. Colocar cubierta de la cámara Makler presionando suavemente para homogeneizar el volumen de la muestra en la superficie de la cámara.
 - **NO debe tener burbujas de aire.** Limpiar la cámara con una torunda de algodón con alcohol de ser necesario, dejar secar y repetir el alicuotado.
29. Valorar la **cuenta espermática** contando los espermatozoides presentes en 100 cuadrados mediante un contabilizar de células, realizando la observación de 200 a 400 aumentos preferentemente.
 - Contar solamente la cabeza de los espermatozoides que se encuentren en cada cuadrado, las colas dentro del área no deben ser contabilizadas.
 - **Reportar la concentración total de espermatozoides por mililitro, obtenida dividiendo el total de los espermatozoides contabilizados entre 10 y multiplicando por 1×10^6 (un millón).**
 - **Reportar el número de espermatozoides totales por eyaculado, obtenida multiplicando la concentración total de espermatozoides por el volumen de eyaculado.**
30. Limpiar la cámara con una torunda de algodón con alcohol y dejar secar.

Citomorfolología espermática

31. Realizar una dilución de la muestra con solución fisiológica, a 100 μ L de volumen final en un tubo de microcentrífuga de 0.6 mL o 1.5 mL.
 - Realizar la dilución de acuerdo a la concentración espermática aproximada:
 - Baja: Sin dilución.
 - Regular: Dilución 1:2.
 - Buena: Dilución 1:3.
 - Muy buena: Dilución 1:5.
32. Preparar un extendido citológico de la muestra diluida. Para ello, mezclar bien la muestra de líquido seminal en el tubo cónico.
 - **No mezclar la muestra tan vigorosamente como para crear burbujas de aire. No mezclar mediante vórtex a alta velocidad, ya que dañará los espermatozoides.**
33. Retirar de inmediato una alícuota de 5-10 μ L de líquido seminal, dependiendo de la concentración de espermatozoides, sin dejar tiempo para que los espermatozoides salgan de la suspensión, mediante una micropipeta.
34. Aplicar la alícuota sobre un extremo de un portaobjetos limpio (base).
35. Colocar un cubreobjetos (extensor) contra la superficie del portaobjetos formando un ángulo de 30 a 45°.

-
36. Acercar el cubreobjetos extensor a la gota de semen, desplazándolo sin despegarlo del portaobjetos base.
 37. Dejar que se extienda la gota sobre el borde del cubreobjetos extensor llenando el ángulo entre portaobjetos y cubreobjetos.
 - No permitir que la gota de semen permanezca en el extremo del cubreobjetos por más de un par de segundos antes de extender.
 38. Hacer retroceder lenta, suavemente y de manera continua el cubreobjetos extensor (durante aproximadamente 1 segundo) a lo largo del portaobjetos base para producir el frotis.
 - Asegurarse de usar el cubreobjetos extensor delante de la gota para "tirar" el semen a través del portaobjetos base; no usar el cubreobjetos para "empujar" el semen desde atrás.
 39. Secar la extensión al aire.
 40. Rotular la base del portaobjetos base mediante lápiz diamante.
 41. Realizar procedimiento de tinción de Papanicolaou. Preparar un set de cubetas de tinción con las soluciones necesarias en cada pozo.
 42. Fijar laminillas con etanol al 96% por 1 minuto.
 43. Secar extensión al aire completamente.
 44. Lavar con agua de grifo durante 1 minuto.
 45. Introducir preparaciones en Hematoxilina de Harris durante 1½ minuto.
 - **La Hematoxilina de Harris debe ser filtrada semanalmente mediante papel filtro y embudo de vidrio.**
 46. Lavar laminillas en agua destilada de 1½ a 5 minutos.
 47. Sumergir laminillas en el colorante OG-6 durante 1½ minutos.
 - **El colorante OG-6 debe ser filtrado antes de su uso mediante papel filtro y embudo de vidrio.**
 48. Enjuagar con etanol al 96% mediante dos cambios con 10 inmersiones en cada uno.
 49. Teñir con el colorante EA-50 durante 1½ minutos.
 - **El colorante EA-50 debe ser filtrado antes de su uso mediante papel filtro y embudo de vidrio.**
 50. Deshidratar y aclarar a través de dos cambios de etanol al 96% cada uno, con 20 y 10 inmersiones respectivamente, seguido de 10 inmersiones en etanol absoluto; y finalmente en un cambio de xileno de 1 a 5 minutos.
 51. Agregar de 1 a 3 gotas de medio de montaje Entellan® a cada portaobjetos.
 52. Adherir cubreobjetos dejando que la resina se extienda por todo el portaobjetos (montaje).
 53. Analizar la **morfología espermática** de mínimo 200 espermatozoides, realizando la observación a 1000 aumentos utilizando aceite de inmersión.
 - Realizar la evaluación por duplicado de ser necesario, mediante el replicado de la preparación (paso 32 a 52).
 - Evaluar el porcentaje de formas normales y anormales en base a los siguientes criterios de normalidad morfológica del espermatozoide:
-

-
- La cabeza debe ser lisa, contorneada regularmente, y generalmente de forma ovalada. Debe haber una región acrosomal bien definida que comprenda 40 a 70% del área de la cabeza, que no debe contener grandes vacuolas, y no más de dos vacuolas pequeñas, que no deben ocupar más del 20% de la cabeza del espermatozoide. La región post-acrosomal no debe contener vacuolas.
 - La pieza intermedia debe ser delgada, regular y aproximadamente de la misma longitud que la cabeza del espermatozoide. El eje mayor de la pieza intermedia debe estar alineado con el eje mayor de la cabeza del espermatozoide. El citoplasma residual se considera una anomalía solo cuando está en exceso, es decir, cuando excede un tercio del tamaño de la cabeza del espermatozoide.
 - La pieza principal debe tener un calibre uniforme a lo largo de su longitud, ser más delgada que la pieza intermedia y tener una longitud aproximada de 45 μm (aproximadamente 10 veces la longitud de la cabeza). Se puede volver a enrollar sobre sí mismo, siempre que no haya un ángulo agudo indicativo de una ruptura flagelar.
 - Realizar la clasificación diferencial de espermatozoides anormales mediante los criterios de Kruger. Deben reportarse las siguientes categorías de defectos:
 - Defectos en la cabeza: macrocéfalo, microcéfalo, bicéfalo, piriforme, amorfo, cabeza de alfiler.
 - Defectos en el núcleo: disminuido, elongado, binucleado, multinucleado, segmentado, descondensado, vacuolado.
 - Defectos del acrosoma: áreas acrosómicas pequeñas o grandes (<40% o >70% del área de la cabeza), vacuolado, sin acrosoma (cabeza amorfa o redonda).
 - Defectos del cuello y la pieza intermedia: engrosada, doblada, anormalmente delgada o cualquier combinación de éstas.
 - Defectos de la pieza principal: curva, corta, doble, enrolladas o cualquier combinación de éstas.
 - Exceso de citoplasma residual (ERC): espermatozoides caracterizados por grandes cantidades de citoplasma con tinción irregular, un tercio o más del tamaño de la cabeza del espermatozoide.
 - Alteraciones mecánicas: cabezas o flagelos sueltos.

APÉNDICE B

Técnica de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCD)

Material y equipo:

Preparación de soluciones

- Balanza analítica
- Frascos de vidrio con tapa
- Vaso o matraz de vidrio
- Probeta

Preparación de agarosa

- Baño de calentamiento
- Placa de calentamiento
- Termómetro
- Probeta
- Matraz Erlenmeyer
- Micropipeta 10-100 μ L
- Tubo de microcentrifuga 0.2 mL
- Portaobjetos 25x75 esmerilado
- Gasa o algodón

Procedimiento

- Baño de calentamiento
- Refrigerador
- Microscopio de campo claro
- Contabilizador de células
- Tubo Eppendorf 0.6-2.0 mL
- Micropipeta 10-100 μ L
- Pinzas de pulgar
- Cubreobjetos 22x50
- Placa de Petri
- Aplicadores de madera

Reactivos:

- Agua destilada
- Etanol
- PBS
- Agarosa estándar
- Agarosa de bajo punto de fusión
- Ácido clorhídrico
- Trisaminometano (Tris)
- Ditioneitol (DTT)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico
- Dodecilsulfato sódico (SDS)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Ácido bórico
- Colorante de Wright
- Buffer de Wright
- Aceite de inmersión

Muestra

- Líquido seminal o fracción enriquecida de espermatozoides

Procedimiento

Preparación de agarosa de bajo punto de fusión

1. Encender el baño de calentamiento, ajustar temperatura aproximadamente a 50 °C y atemperar baño de agua.

-
2. Preparar una **solución de agarosa de bajo punto de fusión 1%** en un matraz Erlenmeyer.
 3. Calentar brevemente en horno microondas hasta su disolución completa (solución transparente cristalina).
 4. Transferir matraz al baño de calentamiento.
 5. Depositar 70-100 μ L de la solución de agarosa de bajo punto de fusión 1% en un tubo de microcentrifuga de 0.2 mL mediante una micropipeta. Repetir alícuotado en tubos individuales.
 6. Conservar a temperatura ambiente para su uso inmediato. En caso de almacenamiento, conservar en refrigeración (4 °C o -20 °C) hasta su uso.

Preparación de portaobjetos recubiertos con agarosa estándar

1. Encender el baño de calentamiento, ajustar temperatura aproximadamente a 80 °C y atemperar baño de agua utilizando un termómetro en el caso necesario.
2. Preparar una **solución de agarosa estándar 0.65%** en un matraz Erlenmeyer.
3. Calentar 1 minuto en horno microondas y hasta su disolución completa (solución transparente cristalina).
4. Transferir solución a una jarra Coplin previamente atemperada.
 - No calentar la jarra Coplin en placa de calentamiento, ya que podría generar ruptura del vidrio.
 - En su defecto puede utilizarse cualquier otro recipiente de vidrio de laboratorio, ajustando el volumen de solución necesaria para la preparación de la lámina delgada de agarosa sobre el portaobjeto.
5. Transferir jarra Coplin (o el recipiente de vidrio) al baño de calentamiento.
 - Asegurar que no exista contaminación de sales en la solución ya que podría provocar problemas en la recubierta de agarosa. Para ello utilizar espátula y cristalería limpia en su preparación, y almacenar mediante parafilm o cerrado hermético.
6. Limpiar un portaobjetos 25x75 esmerilado (o los que sean necesarios) mediante una gasa o algodón con metanol.
 - Los portaobjetos deben tener vidrio esmerilado únicamente de un lado, para asegurar que la capa de agarosa se encuentre sobre la parte superior.
7. Colocar portaobjetos a 60 °C en placa de calentamiento hasta secar completamente.
 - Asegurarse que los portaobjetos no tengan un aspecto grasiento.
 - Los portaobjetos pueden ser almacenados en un ambiente seco y libre de humedad hasta su uso.
8. Sumergir portaobjetos en la solución de agarosa estándar 0.65% acuosa a 80 °C durante 1 minuto.

-
9. Recoger una delgada capa de agarosa líquida y limpiar la parte inferior del portaobjetos mediante una gasa o papel.
 - La capa de agarosa debe tener una distribución uniforme en el cubreobjetos.
 - Alternativamente, puede aplicarse una capa de 100-700 μL de la solución de agarosa sobre el portaobjetos, seguido de un cubrimiento con un cubreobjetos 22x50 previamente lavado.
 10. Transferir portaobjetos con recubrimiento de agarosa a la placa de calentamiento hasta el secado y la solidificación completa de la capa de agarosa.
 - La agarosa adquiere un aspecto casi transparente y poco reflexivo. Asegurar el recubrimiento raspando cada extremo del mismo.
 - En caso de utilizar cubreobjetos, retirar después de la solidificación.
 - Alternativamente, el secado puede realizarse a temperatura ambiente en un área libre de polvo y humedad.
 11. Almacenar en refrigeración (4 °C o -20 °C) mediante desecante hasta su uso.

Técnica de dispersión de la cromatina del espermatozoide

1. Encender el baño de calentamiento, ajustar temperatura aproximadamente a 100 °C y atemperar baño de agua utilizando un termómetro en el caso necesario.
 - En su defecto, puede utilizarse un baño de agua mediante vaso de precipitado y placa de calentamiento.
2. En caso de líquido seminal, diluir una alícuota a una concentración de 10 millones de espermatozoides/mL y un volumen final de 100 μL con PBS en un tubo Eppendorf de 0.6-2.0 mL.
3. Colocar un tubo (o los que sean necesarios) con gel de agarosa de bajo de fusión en el baño de agua a 100 °C durante 5 minutos para fundir la agarosa.
 - Manipular mediante pinzas de pulgar.
4. Manipular el tubo a 37° C por 1 minuto, para permitir la estabilización del gel.
5. Agregar inmediatamente 30 μL de la muestra al tubo de agarosa de bajo punto de fusión fluidificada y atemperada (concentración final de 0.7%).
6. Homogenizar la mezcla mediante pipeteo suave.
7. Depositar rápidamente 50 μL de la mezcla sobre un portaobjetos recubierto con el gel de agarosa estándar y colocar inmediatamente un cubreobjetos de 22x50.
8. Solidificar agarosa a 4 °C por 5 minutos.
9. Retirar cubreobjetos suave y cuidadosamente.
10. Sumergir portaobjetos en posición horizontal en una bandeja con una solución de desnaturalización durante 7 minutos a 22 °C en oscuridad.
 - **Solución de desnaturalización: HCl 0.08 N.**

-
11. Retirar solución de desnaturalización y sumergir portaobjetos en posición horizontal en una bandeja con una solución de neutralización y lisis I durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - **Solución de neutralización y lisis I: Tris 0.4 M, DTT 0.8 M, SDS 1%, EDTA 50 mM, pH 7.5.**
 12. Retirar solución de neutralización y lisis I y sumergir portaobjetos en posición horizontal en una bandeja con una solución de neutralización y lisis II por 5 minutos a temperatura ambiente.
 - **Solución de neutralización y lisis II: Tris 0.4 M, NaCl 2 M, SDS 1%, pH 7.5.**
 13. Lavar dos minutos en posición horizontal en una bandeja con buffer TBE.
 - **Buffer TBE: Tris-borato 0.9 M, EDTA 0.002 M, pH 7.5.**
 14. Deshidratar a través de tres cambios de etanol (70%, 90% y 100%), en posición horizontal durante 2 minutos en cada cambio.
 15. Secar portaobjetos al aire.
 16. Añadir el colorante de Wright cubriendo toda la superficie del portaobjetos, y dejar reposar durante 3 minutos.
 17. Agregar el buffer Wright para permitir la reacción, dejar reposar 5 minutos.
 18. Retirar el exceso de las soluciones realizando lavados con agua.
 19. Secar portaobjetos al aire.
 20. Analizar los **nucleoides** de mínimo 200 espermatozoides, realizando la observación a 1000 aumentos utilizando aceite de inmersión.
 - Categorizar los diferentes tamaños de halo utilizando el diámetro menor del núcleo central del propio nucleoide como punto de referencia, con la cual se compara la anchura del halo. Clasificar en cinco categorías de dispersión:
 - Espermatozoides con halos grandes: Cuya anchura es similar o mayor que el diámetro del núcleo central de menor tamaño.
 - Espermatozoides con halos medianos: Cuyo tamaño está entre los de halo grande y halo muy pequeño.
 - Espermatozoides con halos muy pequeños: Cuya anchura es igual o menor de 1/3 del núcleo de menor diámetro.
 - Espermatozoides sin halo.
 - Espermatozoides con halo degradado: Similar a los espermatozoides sin halo, pero ligeramente irregular o irregularmente teñidos.
 - Calcular el porcentaje de cada grupo de ser necesario, reportando el número entero más próximo.

APÉNDICE C

Procedimiento de extracción orgánica fenol-cloroformo

Material y equipo:

- Microcentrífuga
- Vórtex
- Micropipeta
- Pinzas estériles
- Tubos DNA IQ™ Spin Basket
- Filtros Amicon Ultra 0.5
- Tubos de microcentrífuga 2 mL

Reactivos:

- Trisaminometano (Tris)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Nonidet
- Ditioneitol (DTT)
- Proteinasa K (20 mg/mL)
- Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico 25:24:1
- Buffer Low-TE

Muestra

- Líquido seminal

Procedimiento

1. Alicuotar un volumen suficiente de muestra, de acuerdo con la concentración de espermatozoides recuperada en cada fracción en un tubo de centrifuga.
2. Añadir 300 µL de buffer de lisis a la muestra.
 - **Buffer de lisis: Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.005 M, NaCl 0.05 M, Nonidet 1%.**
3. Añadir 12.5 µL de DTT y 7.5 µL de proteinasa K (20 mg/mL) a la mezcla, y agitar mediante vórtex aproximadamente 3 segundos.
4. Incubar a 60 °C durante 24 horas.
5. Transferir mezcla procesada a una canastilla DNA IQ™ Spin Basket.
6. Centrifugar a $\geq 20,000$ g durante 3 minutos.
7. Retirar canastilla mediante pinzas estériles y desecharla.
8. Agregar 300 µL de una mezcla comercial fenol/cloroformo/alcohol isoamílico al filtrado, y agitar mediante vórtex aproximadamente 5 segundos hasta formar una emulsión de aspecto lechoso.
9. Centrifugar a $\geq 20,000$ g durante 5 minutos para separar las fases.
 - En caso de que durante el proceso se mezclen las fases, volver a centrifugar.
10. Ensamblar un filtro Amicon Ultra 0.5 en un tubo de microcentrífuga de 2 mL previamente rotulado.

-
11. Transferir fase acuosa superior al filtro mediante una micropipeta, cuidando de no tocar la fase orgánica.
 12. Tapar el filtro y centrifugar a $\geq 7,000$ g durante 10 minutos.
 13. Remover cuidadosamente el filtro mediante pinzas estériles y decantar el líquido filtrado del tubo, posteriormente colocar nuevamente el filtro en el tubo.
 14. Añadir 300 μ L de Buffer Low-TE al filtro y centrifugar a $\geq 7,000$ g durante 10 minutos para un primer lavado.
 15. Añadir 150 μ L de Buffer Low-TE al filtro y centrifugar a $\geq 7,000$ g durante 10 minutos para un segundo lavado.
 16. Transferir el filtro Amicon Ultra 0.5 de manera invertida en un tubo de microcentrífuga de 2 mL nuevo, previamente rotulado.
 17. Centrifugar a 1,000 g durante 5 minutos para recuperar el ADN en un volumen aproximado de 15 μ L.
 18. Desechar el filtro y conservar el filtrado (Extracto de ADN) entre 4 y 8 °C.

APÉNDICE D

Procedimiento de cuantificación de ADN

Material y equipo:

- 7500 Real-Time PCR System for Human Identification
- Microcentrífuga
- Vórtex
- Micropipeta
- Tubo de microcentrífuga 2 mL
- Tubo de PCR 0.2 mL (tiras)

-Reactivos:

- Quantifiler™ THP DNA Standard (100 ng/ μ L)
- Quantifiler™ THP DNA Dilution Buffer
- Quantifiler™ Trio Primer Mix
- Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix

Muestra

- ADN

Procedimiento

Preparación de estándares

1. Etiquetar 6 tubos de microcentrífuga para las diluciones en serie del 1 al 6 (20 ng/ μ L, 4 ng/ μ L, 0.8 ng/ μ L, 0.16 ng/ μ L, 0.032 ng/ μ L y 0.006 ng/ μ L).
2. Agregar 40 μ L del buffer de dilución a cada tubo.

3. Mezclar mediante vórtex el estándar Quantifiler™ THP DNA (100 ng/μL) y dar un centrifugado rápido.
4. Agregar 10 μL del estándar al tubo 1, y mezclar mediante vórtex.
5. Transferir 10 μL de la solución estándar del tubo 1, y agregarla al tubo subsiguiente (tubo 2), mezclar mediante vórtex. Repetir paso para los tubos de las diluciones estándar 3 a 6.

Preparación de reacciones

1. Calcular el volumen de cada componente necesario para cada experimento usando la siguiente tabla. Considerar 6 estándares y la adición de 1 control positivo y 1 control negativo por experimento.

Componente	Volumen por reacción
Quantifiler™ Trio Primer Mix	8 μL
Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix	10 μL

2. Descongelar el Quantifiler™ Trio Primer Mix por completo, mezclar mediante vórtex y dar un centrifugado rápido. Agitar suavemente el Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix y dar un centrifugado rápido.
3. Colocar los volúmenes requeridos de cada componente en un tubo de microcentrífuga.
4. Mezclar la mezcla mediante vórtex y dar un centrifugado rápido.
5. Distribuir 18 μL de la mezcla de PCR dentro de cada pozo de reacción de los tubos de PCR, previamente rotulados.
6. Agregar 2 μL de muestra, estándar o control positivo al pozo de reacción correspondiente.
7. Sellar la tira de tubos de PCR mediante la tapa y el instrumento de sellado. Centrifugar brevemente.
8. Procesar mediante el sistema en automático del equipo de PCR en tiempo real (qPCR) 7500 Real-Time PCR System for Human Identification.

APÉNDICE E

Procedimiento de amplificación del gen de la amelogenina

Material y equipo:

- Cámara de PCR
- Termociclador
- Microcentrífuga
- Vórtex
- Micropipeta
- Tubo de microcentrífuga 2 mL
- Tubo de PCR 0.2 mL

Reactivos:

- GlobalFiler™ Master Mix
- GlobalFiler™ Primer Mix

Muestra

- ADN

Procedimiento

1. Calcular el volumen de cada componente necesario para cada experimento usando la siguiente tabla. Considerar la adición de 1 control positivo y 1 control negativo por experimento.

Componente	Volumen por reacción
GlobalFiler™ Master Mix	4.5 µL
GlobalFiler™ Primer Mix	1.5 µL

2. Transferir componentes a la cámara de PCR, previamente desinfectada. Descongelar componentes por completo, mezclar mediante vórtex y dar un centrifugado rápido.
3. Colocar los volúmenes requeridos de cada componente en un tubo de microcentrífuga.
4. Mezclar la mezcla mediante vórtex y dar un centrifugado rápido.
5. Distribuir 6 µL de la mezcla de PCR dentro de cada pozo de reacción de los tubos de PCR, previamente rotulados.
6. Agregar 9 µL de muestra o control positivo al pozo de reacción correspondiente (considerar una masa no superior a 0.3 ng de ADN por tubo, agregar agua de ser necesario para realizar una dilución de la muestra en el volumen final de 9 µL).
7. Sellar los tubos de PCR y centrifugar brevemente.
8. Incubar en un termociclador bajo las siguientes condiciones de ciclado para la amplificación.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Activación	95 °C	1 minuto	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	10 segundos	30 ciclos
Alineamiento y extensión	59 °C	90 segundos	
Extensión final	60 °C	10 minutos	1 ciclo

9. Almacenar el ADN a -20 °C hasta su uso.