



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFFECTO DE LA INFUSIÓN DE *Pleurothallis cardiothallis* SOBRE LA
SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS POR SU
CARGA GÉNICA X y Y.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:
EVERARDO HERRERA CABRERA

DIRECTORA: DRA. ROSALINA MARÍA DE LOURDES REYES LUNA
CODIRECTORA: M.C. MONTSERRAT VÁZQUEZ BALBUENA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
FACULTAS DE Cs. BIOLÓGICAS

OTOÑO 2020



Agradecimientos

Estos agradecimientos van para todas aquellas personas que me apoyaron durante el transcurso de mi estancia dentro y fuera de la universidad.

Agradecer a mis amigos quienes me han apoyado a que mi estancia fuera menos complicada en especial a Kenya quien fue la primera persona en extenderme una mano y su amistad durante un gran cambio para mí, a Elisa quien me enseñó siempre a levantarme sin importar la adversidad además de hacerme ver que hay una gran diversidad de colores y que sin importar con cual te identifiques siempre estará bien, Fernanda y Dani por enseñarme a solo tomar las críticas constructivas. Martin, Diego, Yhulma, Eduardo, Edgar gracias por enseñarme que la amistad verdadera siempre va a durar sin importar el tiempo o la distancia, a todos aquellos amigos que fueron donadores que sin ellos esto no podría ser posible, podría seguir con la lista, pero nunca acabaría, agradezco aquellos compañeros y amigos que han formado parte de mi vida.

Agradezco al laboratorio de biología de la reproducción de la facultad de ciencias biológicas de la BUAP, a mis profesores por enseñarme y darme las herramientas necesarias durante cada clase. Agradecer a la Dra. Yvonne Rosenstein y a la Maestra Erika Melchy quienes me apoyaron con la citometría sin conocerme y sin pedir nada a cambio.

Dedicatoria

Dedico con todo mi corazón mi tesis mis padres quienes me han apoyado en todos los sentidos desde que tengo razón de conciencia en cumplir cada una de mis metas y sueños para llegar hasta aquí., a mis hermanos quienes siempre han estado a mi lado escuchándome y aconsejando.

Dedico un homenaje a los Doctores y profesores que fueron esenciales para la elaboración de esta tesis, la Dra. Rosalina Reyes Luna quien a pesar de que no he sido el mejor de sus estudiantes me ha formado en el área de mi interés, compartiendo su experiencia, conocimientos, tiempo y un poco de su vida conmigo. Agradecer a la Mtra. Montserrat Vázquez Balbuena por compartir un poco de su conocimiento, alentarme cada vez que se ponían las cosas difíciles, por aguantarme en sus materias y llamarme la atención cada vez que cometía un error, aconsejarme más allá de cuestiones escolares al igual que la bióloga Sayra Zambrano la maestra Montserrat Vázquez Balbuena quien ha sido importante en mi formación, la bióloga Sayra Zambrano por aconsejarme y apoyarme, a la doctora Rosalina Reyes Luna quien es un pilar fundamental para mi formación profesional y sin más al doctor Néstor M. Delgado⁺ quien fue el pilar para este proyecto de tesis y sigue dejando su legado de conocimientos para estas generaciones.

Índice	
Agradecimientos	2
Dedicatoria	3
Resumen	6
Introducción	8
Antecedentes	11
Justificación	14
Pregunta de investigación	15
Objetivo General	15
Objetivos particulares	15
Material y Métodos	16
Diseño Experimental	16
Esquema de trabajo	17
Muestras vegetales	18
Muestras humanas	18
Seminograma	19
Examen macroscópico:	19
Examen microscópico:	20
Elaboración de infusiones de la orquídea	22
Incubaciones	22
Citometría de flujo	23
Resultados	24
Motilidad	25
Determinación de proporción de espermatozoides X y Y por citometría de flujo	25
Discusión	27
Perspectivas del proyecto.	29
Conclusión	29
Bibliografía	30
Anexos	33
A-1 Tabla de Devianza	33
A-2 Instrucciones para la recolección de una muestra de semen por el donador.	34
A-3 Formato del cuestionario para donadores de semen	35
A-4 Consentimiento informado para la donación de muestras de semen ... 36	

A-5 Formato del reporte de la espermatobioscopía.	37
A-6 Soluciones	38
Ciclo Celular por tinción con DAPI	38
Preparación de Paraformaldehyde (PFA)	38
Preparación de Buffer de Fosfatos Salino (PBS)	39

Resumen

Las divisiones celulares que se producen durante la espermatogénesis pueden generar errores en la distribución del material genético lo cual puede llegar a provocar enfermedades y/o síndromes en la descendencia, dentro de estos errores encontramos aquellos que están ligados a los cromosomas sexuales.

En la actualidad las parejas buscan evitar estos problemas en su descendencia optando por la selección del sexo. En los centros de reproducción asistida cuentan con técnicas que permiten esta selección, pero el acceso a ellas es difícil debido a los costos elevados, los bajos niveles de éxito y al ser técnicas invasivas a nivel celular.

Hoy en día se buscan alternativas más naturales y que disminuyan el riesgo de daño para el embrión, para ello se han realizado diversos estudios con el uso de plantas medicinales en las diferentes áreas de la reproducción. La elaboración de listados de plantas medicinales y sus usos han ido en aumento, lo que incluye aquellas que se utilizan en reproducción, entre estas se encuentra *Pleurothallis cardiothallis* (Orchideacea) a la que, de acuerdo con la medicina tradicional y herbolaria oaxaqueña, se le adjudica la propiedad de que quien la ingiera engendrara un varón. A pesar de las creencias no hay una base científica que sustente las propiedades de dicha planta, por lo que en este proyecto determino si las infusiones al ponerlas en contacto con espermatozoides humanos producen su separación con base en su carga genética. Para ello se elaboraron infusiones de hoja, tallo y raíz, se recolectaron muestras de semen de donantes con diagnóstico de Normozoospermia, se procedió a realizar incubaciones de las muestras a las cuales se les incorporo las infusiones obtenidas de la orquídea a 37°C. Se observó que parte de las células se precipitaban y parte de las células quedaban en el sobrenadante. A las células del sobrenadante se les determinó movilidad y viabilidad, posteriormente se fijaron para la identificación del cromosoma sexual por medio de citometría de flujo.

Los resultados obtenidos en la identificación de los espermatozoides con cromosoma X con respecto al Y, estadísticamente no se logra observar una

separación de los espermatozoides con respecto a la presencia del cromosoma sexual. Respecto a la movilidad espermática, existe diferencia significativa entre los dos tratamientos y el control, teniendo como resultado el aumento de espermatozoides inmóviles. Es necesario realizar más estudios para determinar que la infusión de *Pleurothallis cardiothallis* puede inhibir la movilidad de los espermatozoides X y dejar libres los Y, favoreciendo la procreación de hijos varones.

Introducción

Las células germinales pasan por un proceso denominado gametogénesis, durante el cual, a través de la división meiótica, se reduce la cantidad de cromosomas del número diploide ($2n$ ó 46) a un número haploide ($1n$ ó 23) en humanos (Martínez, 2013).

En los machos la espermatogénesis, es el proceso por el cual una célula germinal denominada como espermatogonia, entra en división meiótica y se convierte en dos espermatocitos primarios, que maduran hacia dos espermatocitos secundarios, que a su vez entran en división celular dando como resultado cuatro células hijas llamadas espermátides, cada una con 23 cromosomas monovalentes, dos de estas tendrán el cromosoma sexual X mientras que las otras dos tendrán el cromosoma Y, estos cromosomas son los que determinan el sexo del individuo (Gilbert, 2005). En los mamíferos, el primer factor determinante del sexo es el complemento cromosomal presente en el espermatozoide fertilizante. Así en el macho la producción de espermatozoides X- ó Y- es aproximadamente 50:50 % de acuerdo con la Ley de Segregación de Mendel.

Las divisiones celulares que se producen durante la espermatogénesis pueden llegar a generar errores en la distribución del material genético lo cual puede llegar a provocar enfermedades y/o síndromes en la descendencia, dentro de estos errores encontramos aquellos que están ligados a los cromosomas sexuales (p. ej. aneuploidía, síndrome de Klinefelter, hemofilia, etc.) que no permiten en algunos casos el desarrollo del producto hasta su término o que provoca la muerte prematura de los infantes en algunos casos (Sadler, 2016) .

En la actualidad la inseminación intrauterina con selección de sexo es una técnica de reproducción asistida de baja complejidad con la que antes de la concepción puede seleccionarse el sexo (masculino o femenino) del futuro recién nacido; esta técnica puede ser apropiada desde dos puntos de vista: cuando se desea evitar problemas genéticos que están relacionados con un sexo en particular, y cuando las parejas desean tener un hijo porque en su entorno social es lo indicado (Vidaurri, 2011).

Existe una controversia respecto a la elección del sexo, puesto que en la poblacional mundial existen más hombres (50.6%) que mujeres (49.4%) (INEGI, 2015) aunque no de forma significativa, implicando diversos factores entre los que destacan algunos de orden biológico principalmente: el espermatozoide Y-, al tener menos ADN (2.8%), pesa menos, es más rápido en su desplazamiento que el femenino y por consiguiente fertiliza primero (Karabinus D. , 2009)

Actualmente se han propuesto diferentes métodos para la selección del sexo del bebe, pero estos no dan la certeza de ser efectivos. En los 70s Ericsson y colaboradores desarrollaron la técnica de separación por albumina sérica, la cual consiste en la elaboración de una columna en un tubo de ensaye con diferentes concentraciones de albumina (gradientes), en esta se depositan los espermatozoides y de acuerdo a la diferencia de contenido de DNA, en donde las células con carga Y al ser menos pesadas estas llegaban a las capas de mayor concentración, retiraba los espermatozoides para realizar una fertilización in vitro (FIV) de acuerdo al sexo deseado, posterior a esto realizaba DGP (diagnóstico genético preimplantacional) para determinar el cromosoma sexual (Kouamo, 2014). De acuerdo con los resultados esta técnica tenía un 85% de efectividad, la controversia de esta técnica es que no se ha podido replicar la tasa de éxito registrada por Ericsson et al. (Kouamo, 2014).

Así como la técnica anteriormente mencionada se encuentran otras que presentan un porcentaje mayor o igual pero el problema es que son invasivas a las células germinales y terminan con la muerte de los gametos o del producto (Yadav, 2017) . En la actualidad la técnica más efectiva para seleccionar el sexo la citometría de flujo, la cual surgió entre 1970 y 1980 (Jhonson, 1999), esta consiste en teñir el material genético de las células con un fluorocromo lo cual permite que los espermatozoides permanezcan viables (Karabinus D. S., 2014). El citómetro utiliza rayos láser que provocan una excitación en el fluorocromo y emite una onda de luz que es registrada, permitiendo la identificación de las variaciones del contenido de DNA espermático de acuerdo a las diferencias del cromosoma sexual, a su vez por medio de *Sorting* (clasificación) (Garrido, 2012) se le da una carga eléctrica ya sea positiva o negativa a las células permitiendo la separación por medio de rayos láser

que permiten la atracción de las células de acuerdo a lo requerido por el paciente ya sea para engendrar varones o mujeres, estas células pasan a capilares los cuales desembocan en tubos donde habrá un enriquecimiento de gametos con carga X o Y de acuerdo a lo deseado (Karabinus D. , 2009).

Otro método para la selección del sexo del bebé fue desarrollado en China por Umehara, Tsujita, Shimada (2019) los cuales han logrado realizar la inactivación de genes correspondientes a espermatozoides con cromosoma X, estos genes codifican proteínas que regulan funciones motoras en el espermatozoide, permitiendo enlentecer o detener los espermatozoides con dicho cromosoma, así logrando seleccionar el sexo deseado con la confirmación por medio de la técnica de cariotipos después una Fertilización *in vitro* (Umehara, Tsujita, & Shimada, 2019). Sin embargo, una alternativa para la separación de los espermatozoides Y podría ser el utilizar la herbolaria y/o la medicina tradicional. Existen reportes donde se mencionan el uso de plantas para el control de la reproducción, entre estos encontramos el estudio realizado por Browner (1985) donde describió el uso de estas plantas en comunidades de Oaxaca destacando la mención que se hace de la orquídea *Pleurothallis cardiothallis* la cual es utilizada en forma de infusión para tener varones en la concepción.

Antecedentes

La fitoterapia nombre que recibe al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia, hoy en día estas propiedades vegetativas proporcionan la materia prima de la industria farmacéutica moderna (Alfaro, 1984). Sin embargo, para un porcentaje elevado de plantas se desconoce si poseen propiedades curativas ya que muchas de estas solo son utilizadas como plantas ornamentales, como es el caso de las orquídeas (Orchidaceae) (Waizel-Bucay, 2009).

La investigación etnobotánica orientada al estudio de plantas medicinales ha sido, y sigue siendo muy común en México. Varios investigadores tanto nacionales como extranjeros han dedicado gran parte de sus vidas al estudio de la medicina herbal, esto se debe en gran parte a la diversidad ecológica y cultural de México (Alfaro, 1984). El uso de estas plantas es muy recurrido en diferentes culturas del mundo para tratar malestares que les afectan, que van desde malestares generales hasta problemas de reproducción y control de natalidad (Alfaro, 1984).

Se han realizado una gran variedad de estudios sobre el uso de estas plantas en la reproducción, como el realizado por Damke (2013) quien describió las propiedades de chambimbe o jaboncillo (*Sapindus saponaria*) como anti-*Trichomonas vaginalis* un protozoo que ocasiona secreciones vaginales fétidas, ardor, picazón etc. Tras los tratamientos en forma de ducha vaginal con chambimbe estos síntomas disminuían y con el uso constante del extracto de esta planta el protozoo desaparecía, pero se dieron cuenta que al mismo tiempo de eliminar la infección poseía propiedades como espermicida, dando así una alternativa como método anticonceptivo.

Particularmente, en México se han realizado investigaciones sobre propiedades anticonceptivas de plantas medicinales, como es el caso de Taboada y colaboradores que en los años 90 describieron los efectos de inmovilización/aglutinación de espermatozoides humanos a base de extractos crudos de 6 géneros y 17 especies de la familia *Crassulaceae* (Taboada, 2000) con lo cual se da como alternativa de espermicida natural que funge como un método alternativo utilizado en comunidades del país para evitar la concepción.

Browner (1985) realizó un listado de plantas en el municipio de Dzah-hmi Chantinec en el distrito de Ixtlan, Oaxaca, México, que son usadas en diferentes etapas del proceso reproductivo de las mujeres. Se dividieron los resultados en grupos de acuerdo con la propiedad a la que se le adjudicaban, plantas que ayudan en la recuperación postparto, menorragia y/o hemorragia menstrual, dismenorrea, abortos espontáneos, acelerar la labor de parto o calmar dolores del parto, emenagogos, control de fertilidad, infertilidad y potenciación de la fertilidad. Tras el listado anterior encontramos a *Plurothallis cardiothallis* (Orchideaceae) a la cual se le adjudica la propiedad de engendrar varones tras su uso en forma de infusiones o té.

P. cardiothallis (Orchidaceae) es una planta epífita que crece en bosques de neblina, es erecta y rígida, mide de 20 a 40 cm de alto con tallos secundarios rígidos que van de 18 a 30 cm. Esta revestida de dos vainas apretadas, presenta una hoja cordiforme en su base de 15 a 16 cm, coriácea, con una Inflorescencia fasciculada de una espata duplicada, de 1 a 1.5 cm, flores amarillas, verde-amarillento, rojo pardo, con un labelo que va de verde hasta anaranjado. Sépalos cóncavos, finamente pubescentes en la cara exterior; sépalo dorsal de cinco nervios, con 1.5 cm., sépalos laterales unidos, de 1.5 cm. con 6 nervios principales. Pétalos acuminados, con el ápice encorvado, de 1.1 cm. Labelo auriculado en la base. Con una uña carnosa y corta, cara inferior y bordes finamente ciliados, de 7.5 cm. Se encuentra distribuida desde México hasta Ecuador y su nombre deriva de la forma de corazón que tiene la hoja. En el país se encuentra distribuida en los estados de Oaxaca, Puebla, Veracruz, Chiapas y Tabasco (Fig.1)

El uso de *P. cardiothallis* en las comunidades de Oaxaca se deriva de la doctrina de las firmas la cual menciona que las virtudes de la planta se llevan en el aspecto y no en el nombre (Perdue, 1988), tras esto los pobladores dicen que el aspecto de la planta tiene la forma de genitales masculinos, gracias a esto se le dio el uso a *P. cardiothallis* para que la descendencia deseada fueran varones, se relata que los conyugues (en secreto) daban una infusión de esta planta a sus esposas así obteniendo un hijo del sexo deseado, las esposas de estos varones igual cuentan

con una planta de efecto inverso (*Clidemia setosa*) la cual es usada para el nacimiento de niñas. Debido a lo anterior, el 2018 Rodríguez, Herrera, Arroyo, Vázquez & Reyes-Luna realizaron la determinación de los efectos de distintas infusiones de *P. cardiothallis* y encontraron que las infusiones de hoja o raíz provocan la aglutinación de los espermatozoides humanos sin afectar la viabilidad espermática.

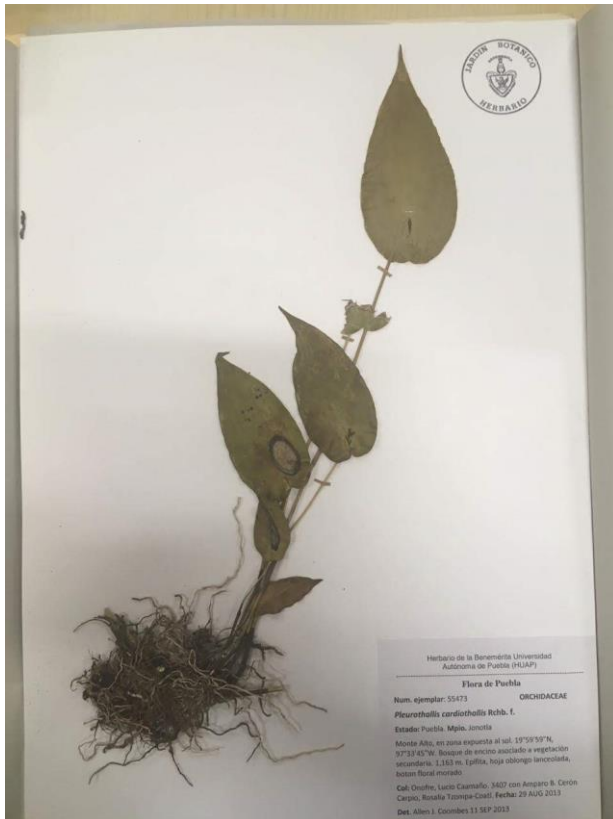


Fig. 1 Ejemplar de la orquídea *Pleurothallis cardiothallis* del herbario del jardín botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Justificación

A partir de 1970 con los programas de Reproducción Asistida, el nacimiento de mujeres se ha incrementado al usar el semen congelado en la inseminación artificial solo en este recurso, aun no se tiene un estudio que determine si existe un aumento de natalidad de mujeres u hombres en embarazos de forma natural.

Por ello, el desarrollo de nuevas técnicas para lograr manipular la selección del sexo del espermatozoide y el conocimiento del par de cromosomas pertenecientes al embrión permitirá, en ultimas estancias, estudiar el desarrollo de enfermedades ligadas al sexo. Esto último sin lugar a duda, redundaría en la prevención de enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales y en el caso de animales de granja, la habilidad para seleccionar el sexo de los espermatozoides para la inseminación de hembras, lo cual tendría un impacto en la disminución de costos para la elaboración de estas técnicas. Más aun, en el caso de las especies de animales en peligro de extinción se podría crear un banco de embriones sexados y así contribuir a la repoblación de estas especies. Sin embargo, una alternativa más sencilla, práctica y económica es el estudio de plantas medicinales que permitiera identificar selectivamente el cromosoma sexual de los espermatozoides, sin la necesidad de involucrarse en un proceso experimental laboriosos y sin utilizar una infraestructura de alta tecnología y costosa.

Las plantas medicinales desempeñan un papel importante en el sistema de atención primaria de salud en el país, además, las plantas son fácilmente accesibles, y su uso forma parte del patrimonio cultural de México. Sin embargo, la documentación de las plantas medicinales utilizadas para las enfermedades reproductivas está dispersa o no se encuentra información sobre sus propiedades con un sustento valido de estas, lo que es más importante aún, las propiedades biológicas y farmacológicas, así como la toxicidad de muchas de estas plantas aún no se conocen (Moteetee, 2016). A pesar de la existencia de listados herbarios de plantas medicinales no hay registros que avalen las propiedades adjudicadas a *P. cardiothallis* a excepción del estudio realizado por Rodríguez, Herrera, Arroyo,

Vázquez & Reyes-Luna (2018) donde se encontró el efecto de aglutinación espermiática, pero esto no da una respuesta clara al efecto adjudicado.

Pregunta de investigación

¿La adición de la infusión de *Pluerothallis cardiothallis* a una muestra de semen humano produce la separación por aglutinación de espermatozoides carga X con respecto a los de carga Y?

Hipótesis

El tratamiento de espermatozoides humanos con la infusión de hojas y/o raíz *P. cardiothallis* aglutina a los espermatozoides con carga X y deja libres a las células con carga Y, por lo que estas podrían fecundar con mayor probabilidad a un óvulo y dar lugar a un embrión de sexo masculino; este efecto es mayor que el causado por la raíz.

Objetivo General

Determinar si la adición de una infusión de *P. cardiothallis* a una muestra de semen enriquece la proporción de espermatozoides humanos con carga Y en suspensión con respecto a los gametos X.

Objetivos particulares

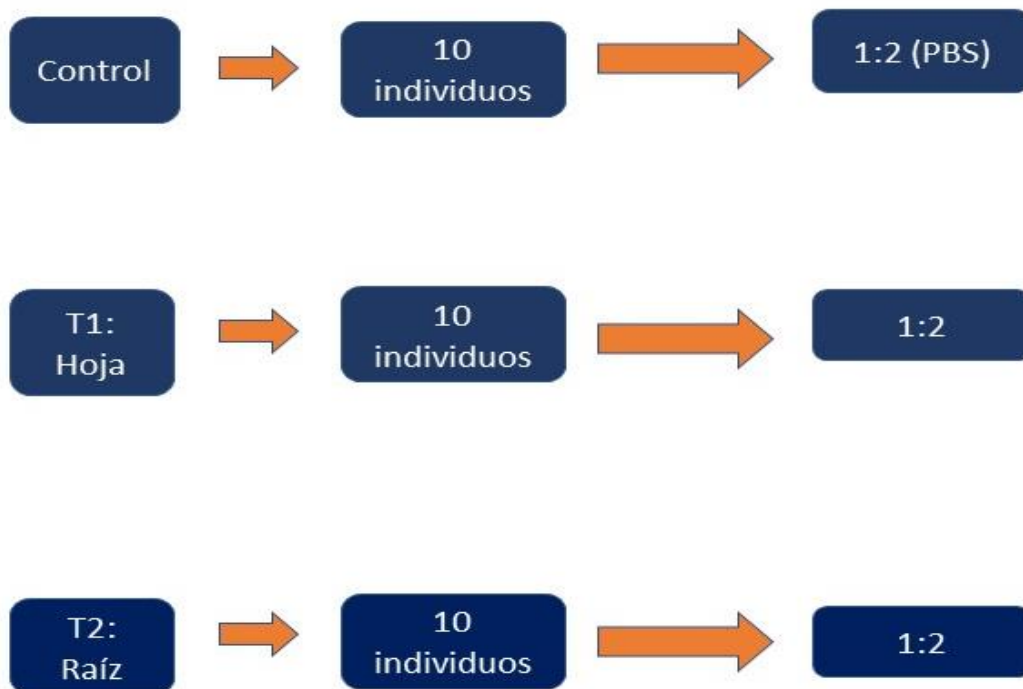
Determinar si hay diferencias en la proporción de gametos X que se aglutinan y la proporción de gametos Y que quedan suspendidos, en una muestra de semen humano incubado con infusión de hoja o raíz, mediante citometría de flujo.

Determinar si hay diferencia en la motilidad total de los espermatozoides humanos incubados con infusión de hoja o de la raíz.

Material y Métodos

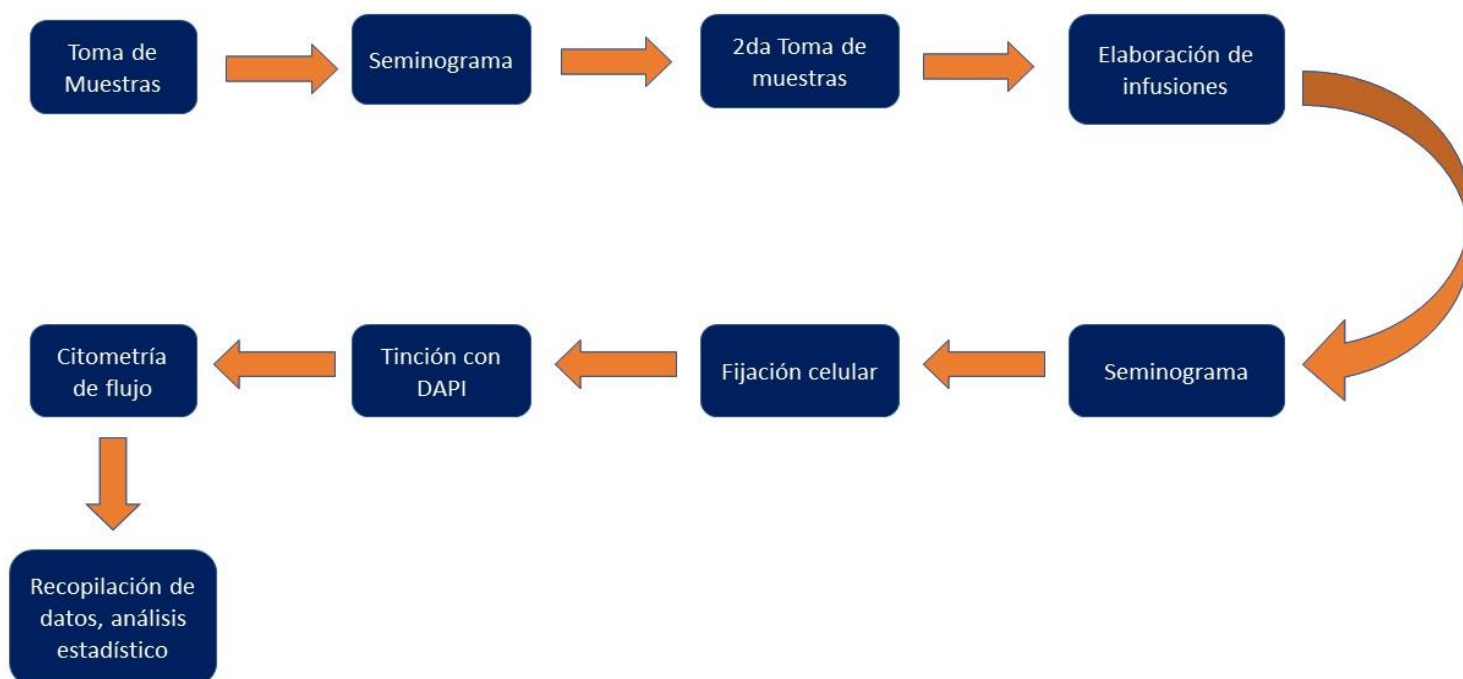
Diseño Experimental

La realización de los experimentos se tomó en cuenta tres grupos donde uno era el grupo control y los otros dos eran hoja y raíz respectivamente, en los tres grupos se requirieron 10 individuos normozoospermicos los cuales donaron muestras respectivamente. se realizó una dilución de 1:2 (semen-Infusión), en el grupo control se agregó PBS como sustituto de infusión para simular las mismas condiciones, en el segundo grupo se agregó infusión de hoja y al tercer grupo se le añadió infusión proveniente de raíz.



Esquema de trabajo

El orden y la organización es muy importante a la hora de trabajar los experimentos, se requirió buscar a los donadores que cumplieran con ciertos requisitos, para esto se les solicito una muestra de semen a la cual se le realizo un seminograma donde se analizaron todos los parámetros correspondientes a este, tras identificar a los individuos normozoospermicos, se les solicito una segunda muestra, mientras estas se incubaban se procedió a la elaboración de las infusiones de hoja y raíz provenientes de *P. cardiothallis*. Se procedió a agregar a las muestras de semen las infusiones (1:2), tras dejar incubar estas se les analizo la motilidad y vitalidad espermática, se realizó una separación del sobrenadante del precipitado celular, se llevó a fijación celular con PFA, tras fijar las células se les añadió del fluorocromo DAPI el cual ayudo para determinar el cromosoma sexual, tras teñir se llevó a citometría para determinar el cromosoma sexual, se realizó una base de datos y se aplicó un ANOVA de dos vías con ayuda de del programa R



Muestras vegetales

El muestreo en las orquídeas se realizó de forma dirigida ya que se obtuvieron por medio de un intermediario con conocimientos empíricos en botánica al cual se le solicitó que los ejemplares fueran adultos y cumplieran con características específicas como un mínimo de 4 hojas verdes, tallos sanos sin perforaciones o presencia de marchitamiento, solicitando un número total de 10 ejemplares.

Muestras humanas

Para el desarrollo del proyecto se trabajó con 10 muestras de semen (Fig.2) de donadores voluntarios que presentaron las siguientes características: tener una edad de 18 a 29 años (promedio 20 ± 2 años) mantener un periodo de abstinencia sexual no menor de 3 días o mayor de 7 días, no padecer alguna enfermedad crónico-degenerativa, autoinmunes, psicopatologías, etc., no haber consumido drogas legales o ilegales en los últimos 3 meses, no haberse realizado tatuajes o perforaciones en los últimos 12 meses, dormir mínimo 7 horas diarias (apéndice A-2).

Antes de iniciar la experimentación, se les solicitó a los donadores llenar un formato con su historial clínico (apéndice A-3), además de firmar el consentimiento informado para la donación de esperma (apéndice A-4). Se solicitó una primera muestra para su diagnóstico por medio de un seminograma basado en los parámetros de la OMS, 2010 (A-5) y solo muestras normozoospermicas se utilizaron en el estudio.

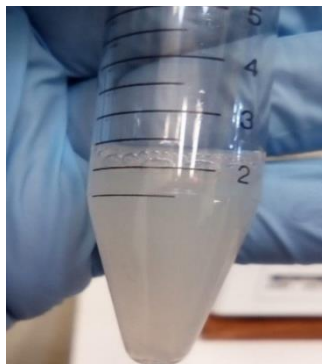


Fig.2 Muestra de esperma humano

Seminograma

Examen macroscópico:

Aspecto: se valoró el aspecto de la muestra de semen de acuerdo con su color, opacidad y la presencia de cuerpo mucoso. Se considera normal cuando el líquido es de color blanquecino, gris blanco opalescente o ligeramente amarillenta

Licuefacción y viscosidad: se registró el tiempo en el que se licuo el coagulo espermático, tras lo cual se midió la viscosidad (fluidez) al determinar cómo normal la formación de un filamento de 2 cm aproximadamente a partir de una gota de la muestra.

Volumen: Se midió el contenido total del eyaculado valor normal ≥ 1.5 ml

pH: Se tomó una gota de la muestra después de la licuefacción y se colocó sobre tiras de pH que contaban con una sensibilidad de 6.5 a 10. Valor normal de 7.2 a 8.0 UA.

Examen microscópico:

Motilidad: Se realizó tomando una alícuota de 10µl de la muestra que se colocó en un portaobjetos limpio y se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm y se observó con un objetivo de 40x. Se realizaron los conteos por campos hasta tener un total de 200 células, se cuentan de acuerdo con la motilidad de éstas, iniciando con las de mayor velocidad y terminando con las inmóviles.

Se calculó el porcentaje de motilidad espermática al contar un total de 200 células como mínimo. Se determinó el tipo de motilidad que presentaban las células de acuerdo con los siguientes parámetros:

Tipo A: Son aquellos espermatozoides que presentan un desplazamiento en una dirección.

Tipo B: Son células que presentan un a movilidad *in situ*, es decir que se mueven en su sitio y no presentan un desplazamiento de ningún tipo.

Tipo C: Son aquellas células que no presentan ningún tipo de movilidad.

Para determinar el resultado total de la motilidad se representa en forma de porcentaje, la determinación de una motilidad normal se toma en cuenta los porcentajes A, B, C y para la determinación total de espermatozoides móviles se toma en cuenta la sumatoria de A+B (valor de referencia: $\geq 40\%$, OMS 2010).

Aglutinación: En una preparación de la muestra de semen se observa en un microscopio óptico la presencia de espermatozoides con uniones entre ellos, estas uniones se pueden localizar en la región de la cabeza, pieza media o cola. Se determinó la aglutinación total haciendo un conteo de 100 campos a 40x y se obtienen los porcentajes de acuerdo con las aglutinaciones totales encontradas por campo (Valor de referencia: $< 5\%$).

Vitalidad espermática: Refleja la cantidad total de espermatozoides vivos y muertos. Se utilizó la técnica de tinción vital con eosina, con esto las células que presentan alteraciones de la membrana plasmática, introducen el colorante al citoplasma de la célula que se observa teñida, indicando muerte celular, así arrojando una coloración purpúrea, aquellos espermatozoides que no presentaron una coloración son considerados como vivos. Se mezcló el semen fresco con la solución de eosina en un tubo Eppendorf (1:1), se tomaron 10 µl de la muestra, se deposita sobre un portaobjetos y se le colocó un cubreobjetos, se analizó en un microscopio óptico a 40x contando un mínimo de 200 células, registrando el número de vivos y muertos, su valor se expresa en porcentajes (Valor de referencia $\geq 58\%$).

Concentración espermática: La muestra de semen se diluyó en un tubo Eppendorf con una solución fijadora correspondiente al número de espermatozoides de acuerdo con la OMS, se colocaron 10 µl en una cámara de Neubauer con ayuda de una micropipeta y se realizó el recuento del cuadrante central con ayuda de un microscopio óptico a 40x. Los espermatozoides de este conteo corresponden al número de células (expresada en millones) por 1 ml de muestra, y tras obtener esta cantidad se multiplicó por la cantidad de volumen total del eyaculado (Valor de referencia: $\geq 39 \times 10^6$ células. /mL).

Elaboración de infusiones de la orquídea

Las infusiones se realizaron a partir de las hojas y la raíz fresca de las orquídeas, se utilizaron 03 g de hojas ó 01 g de raíces, cortadas en trozos, 120 ml de agua destilada y se llevó a ebullición, al estar a punto de hervir se le agregó la hoja y la raíz por separado a cada vaso y se dejó hervir por de 5 minutos, posteriormente se retiraron de la plancha de calor y se dejaron enfriar. Las infusiones se filtraron con ayuda de papel filtro para evitar el paso de residuos de la materia vegetal, se colocaron en frascos estériles, se cerraron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Incubaciones

Posterior a lo anterior, se pidió la segunda muestra de semen a los donadores, se contaron los espermatozoides y se dividieron en 3 alícuotas de 50×10^6 células por 0.5 ml, una alícuota se trató con la infusión de hoja en una dilución de 1:2, una segunda alícuota se trató con la infusión de raíz en la misma dilución y a la tercera alícuota sólo se le adicionó amortiguador PBS (control), posteriormente los tratamientos se incubaron por 20 minutos a baño María a una temperatura de 37°C. En este tiempo se formaron precipitados (espermatozoides aglutinados) en los tubos. Se retiraron los sobrenadantes de los precipitados con ayuda de una micropipeta y a los espermatozoides se les determinó la movilidad y la viabilidad.

Citometría de flujo

Una vez separados los sobrenadantes, se llevó a cabo la fijación celular en medio líquido de acuerdo con el método de Ciclo Celular por tinción con DAPI a una concentración de 500 ng/ml (apéndice A-6).

Los tubos se dejaron reposar en baño maría por 3 minutos, tras esto se les agrego 3 ml de PBS y se llevó a vórtex para homogenizar durante 30 seg. aproximadamente, se agregaron 3 ml de PFA (Paraformaldehído) al 4% dejando reposar por 10 minutos a 37°C tras este periodo de incubación se resuspendieron, agregando 10 ml de PBS para diluir el PFA y se llevaron a centrifuga a 1500 rpm/10 minutos (A-6), se decantó el sobrenadante evitando el desprendimiento de los pellets, estos se resuspendieron en 10 ml de PBS y se homogenizo la muestra llevándola a vórtex durante 30 seg. aproximadamente Se toman 100 µl de muestra, se colocaron estas porciones tubos nuevos y se les añadió 2 ml de etanol frio, se dejaron incubar por 1 hora a -20°C. Tras la incubación se llevó a centrifugar a 1500 rpm/10 minutos donde al terminar se decantó el precipitado y se agregaron 500 µl de DAPI diluido en etanol (500 ng/ml) y se llevó a vortex para homogenizar la muestra durante 30 seg. aproximadamente, se dejó incubar por 30 minutos a 37 °C y se llevó a leer en citómetro FACS Canto II, pasando un aproximado de 10,000 células por evento, se obtuvieron los datos de la caracterización espermática por medio del programa FlowJo® v10 el cual indicó los porcentajes de espermatozoides con el cromosoma sexual X y correspondiente, se hizo la recopilación de datos y se realizó el análisis estadístico con un ANOVA de dos vías con un nivel de significancia de 0.05 (apéndice A-1) .

Resultados

Aglutinación

Se observó después de un lapso de 20 minutos de incubación la formación de precipitados espermáticos en los tubos que contenían las muestras de semen y el extracto de *P. cardiothallis* tanto en hoja como en raíz, estas aglutinaciones eran tan extensas que no se podían contar (Fig. 3).



Fig.3 Aglutinación espermática vista al 10x en microscopio óptico

Motilidad

Al agregar los extractos de hoja y raíz de *P. cardiothallis* a las muestras de esperma se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la motilidad del tipo a+b y un incremento de inmovilidad (Fig. 4). En los tubos con precipitados no se pudo realizar el conteo de motilidad en el tratamiento con raíz ni en el de hoja ya que las aglomeraciones eran tan densas no permitieron un conteo (Fig. 3).

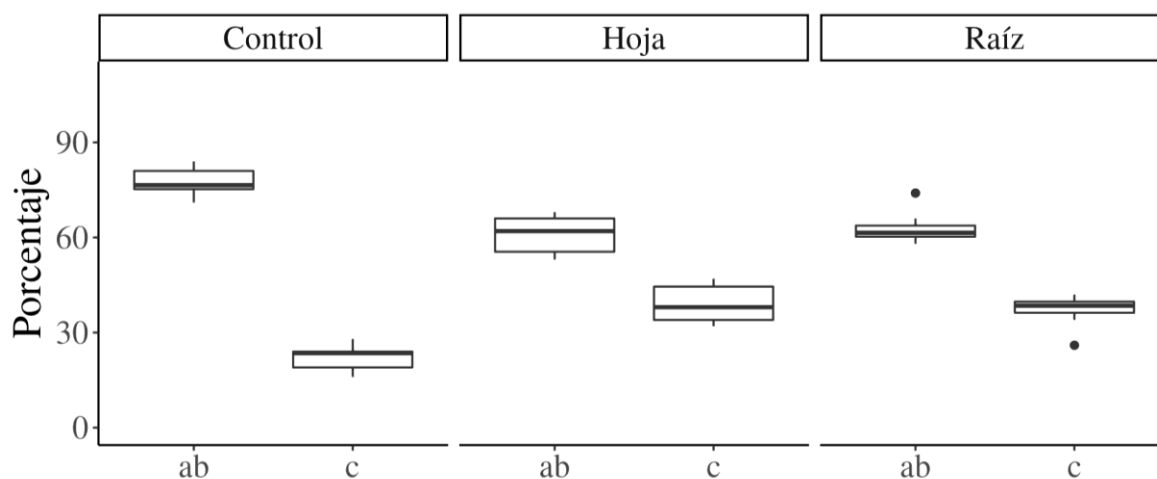


Fig.4 Valores de la motilidad espermática del grupo control contra los tratamientos de hoja y raíz en sobrenadantes, total de espermatozoides móviles (a+b) con el de inmóviles (c) donde los tratamientos son significativamente diferentes ($P < 0.05$) al control, en cambio los tratamientos no son significativamente diferentes entre sí.

Determinación de proporción de espermatozoides X y Y por citometría de flujo

Cuando se realizó la determinación del cromosoma sexual Y en los espermatozoides por medio de la citometría de flujo se observó que no existe una diferencia significativa entre la presencia de espermatozoides X y Y en todos los grupos tanto en sobrenadante como en precipitados.

Sin embargo, en el precipitado de las células tratadas con la infusión de hoja se observó una tendencia en elevar el porcentaje de gametos X en comparación de Y aunque en los sobrenadantes esta tendencia desaparece (Fig. 5-A). En el

tratamiento de raíz no se observa una tendencia hacia ninguna carga espermática tanto en el sobrenadante como en el precipitado (Fig. 5-B)

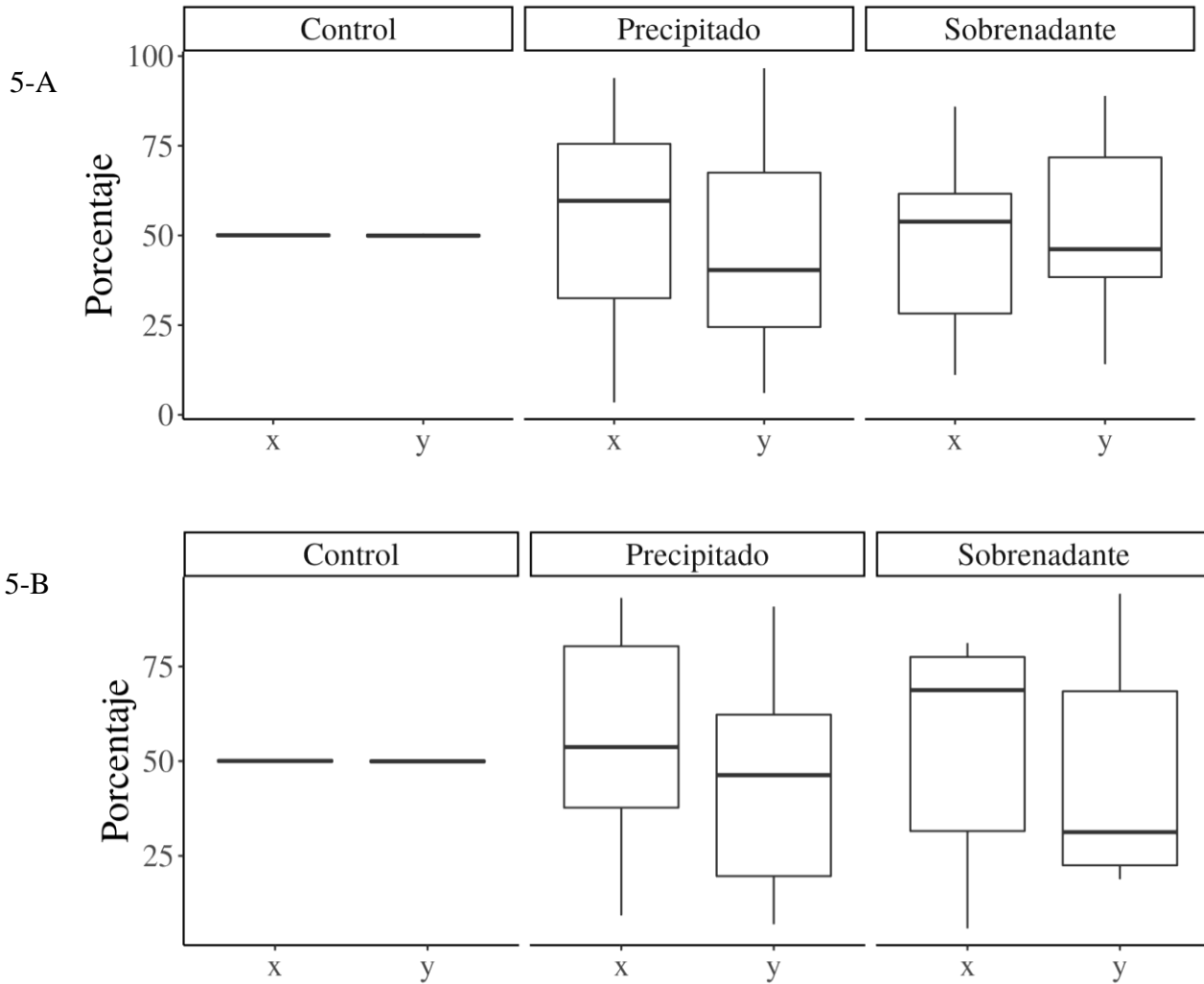


Fig.5 Porcentajes de espermatozoides con carga X y Y presentes en el grupo control y el grupo de células tratadas con la infusión proveniente de hojas (A) o raíz (B) de *P. cardiothallis* no hay diferencias en este porcentaje tanto en el sobrenadante como en el precipitado obtenido después del tratamiento ($P > 0.05$).

Discusión

Browner (1985) reportó las plantas que se usan en algunas comunidades de Oaxaca cuyas propiedades ayudan en los diferentes procesos en la reproducción, entre estas plantas se encuentra *P. cardiothallis* a la cual se le adjudica la propiedad de que la persona que ingiera la infusión engendrara individuos varones.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este proyecto, se reafirma lo obtenido en el estudio de Rodríguez, Herrera, Arroyo, Vázquez & Reyes-Luna (2018) donde las infusiones de hoja y raíz afecta solo la motilidad espermática en forma de aglutinación celular, aumentando la inmovilidad de forma significativa hablando estadísticamente ($p < 0.01$), en sus resultados no se presentó una inviabilidad espermática. Lo encontrado por Rodríguez y colaboradores (2018) al igual que en este proyecto no es un factor suficiente para adjudicarle a esta planta la capacidad de la selección del sexo cuando se aplica de forma directa a los espermatozoides y esto se corroboró con la citometría de flujo donde se expuso que no hay un cambio significativo en la proporción de los espermatozoides humanos.

No obstante, las limitantes presentes en el proyecto pudieron influir con los resultados obtenidos como es el caso de la omisión de la identificación del grado de aglutinaciones espermáticas ya que con estas se hubiese podido generar una comparación con lo marcado por el manual de la OMS (2010) para determinar alguna otra propiedad. Otra limitante fue el no utilizar un modelo animal donde la ingesta de la infusión fuese por vía forma oral como se propone en el estudio de Browner (1985), aunque no se tiene la certeza de que sea realmente la forma en la que se utiliza. Por ello, se optó aplicar directamente a las células ya que no hay estudios sobre los efectos adversos del consumo de esta planta, debido a esto se debe continuar el estudio aplicando la infusión de forma oral en animales de experimentación y realizar un conteo de espermatozoides con carga Y por eyaculado o número de crías machos. La vía de contacto de la infusión con las células espermáticas es importante pues cabe la posibilidad de que al ingerir los compuestos de forma oral en forma de infusión los compuestos o moléculas

cambien por los procesos de decocción (Talapatra, 2015), estos al ser ingeridos y absorbidos en el tracto gastrointestinal afectan a las células blanco (Infante, 2020). Se deben realizar más estudios sobre el efecto aglutinante que las infusiones tuvieron sobre las células espermáticas y determinar las características de las células que son aglutinadas para lograr identificar el factor en común para este efecto.

Así mismo se requieren realizar estudios sobre los efectos de *P. cardiothallis* ya que al no haber información esta puede resultar perjudicial para el usuario ya que no se conoce si presenta algún tipo de toxicidad al ser ingerida en una concentración errónea (Talapatra, 2015), aparentemente no produce muerte celular al aplicarlo de forma directa, según lo indicado en el estudio de Rodríguez y colaboradores (2018). El efecto aglutinante que pueden presentar las muestras espermáticas puede deberse a múltiples factores como es el caso de un problema inmunológico del individuo, cambios de pH, choque térmico, exceso de viscosidad o el no rompimiento del coagulo espermático de acuerdo con la OMS (2010), a pesar de estas posibles causas no se tiene la certeza de por qué el extracto de *P. cardiothallis* produce este efecto. Sin embargo, se han encontrado metabolitos secundarios de plantas con propiedades que pueden llegar a regular la fertilidad masculina (Kamal, 2003). En la actualidad se han realizado investigaciones probando los efectos de diversos metabolitos con efecto aglutinante para la elaboración de anticonceptivos masculinos por ejemplo la elaboración de espermicidas naturales. Dentro de los metabolitos encontramos aceites, saponinas, cumarinas, alcoholes, resinas, fenoles etc. (Kamal, 2003). Derivado del presente proyecto y tratando de identificar los compuestos fitoquímicos causantes del efecto aglutinante Herrera y colaboradores (2019) realizaron la determinación de los metabolitos secundarios de *P. cardiothallis* donde se registró la presencia de los compuestos como cumarinas, taninos, saponinas y flavonoides. Los compuestos encontrados tienen efectos aglutinantes que han sido identificados en otras plantas (Kamal, 2003), estos podrían ser la respuesta al efecto que tiene *P. cardiothallis* ya pueden estar generando un efecto a nivel de membrana ya sea por la activación o inactivación de canales iónicos que

estén presentes en esta (Taboada, 2000), aunque esto solo es una especulación ya que se requiere de la realización de más estudios ya que aún existen muchas incógnitas que rodean a las propiedades de esta orquídea.

Perspectivas del proyecto.

Se requieren estudios que se encaminen a evaluar el nivel de toxicidad que presenta *P. cardiothallis*, así como el posible daño a nivel tisular por vía tópica y oral en las mujeres de las comunidades de Oaxaca donde se lleva a cabo el uso de esta planta, iniciando estas evaluaciones en modelos de laboratorio como es el caso de ratones o ratas. Además, se requiere la identificación de los compuestos activos de *P. cardiothallis* al igual que generar un tratamiento donde se incluyeran todas las estructuras de la planta.

Por otro lado, se debe de considerar el uso de infusiones de *P. cardiothallis* junto a infusiones de otras plantas que pudiesen llegar a ayudar en la selección del sexo de la descendencia.

Conclusión

Los extractos de *P. cardiothallis* reducen significativamente la motilidad espermática, sobre todo la infusión de hoja, al producir la aglutinación de las células. Sin embargo, este efecto no reduce la proporción de espermatozoides con carga X, libres, en comparación de los Y; por lo que no se puede afirmar que el uso de estos extractos, en forma directa, incrementa la probabilidad de engendrar a un embrión de sexo masculino.

Bibliografía

- Alfaro, M. A. (1984). Medicinal plants used in a Totonac Community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 11(3), 203-221.
- Browner, C. H. (1985). Plants Used for Reproductive Health in Oaxaca, Mexico. *Springer on behalf of New York Botanical Garden Press*, 39(4), 482-504.
- Damke, E. (2013). Spermicidal and anti-Trichomonas vaginalis activity of Brazilian Sapindus saponaria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(196), 1-8.
- Garner, D. L. (2001). Sex-Sorting Mammalian Sperm: Concept to Application in Animals. *Journal of Andrology*, 4(22), 519-526.
- Garrido, N. (2012). Aplicaciones del FISH de espermatozoides, la citometría de flujo y el MACS. En D. N. Garrido, *Master en reproducción humana* (pág. 35). Madrid.
- Gilbert, F. S. (2005). Determinación del sexo. En F. S. Gilbert, *Biología del desarrollo* (pág. 881). Buenos aires, Argentina: Editorial medica panamericana.
- Herrera, E. (2019) Comunicación personal 3 de junio del 2019
- Infante, D. A. (2020) Comunicación personal 7 de septiembre del 2020
- INEGI. (2015). *INEGI población*. Obtenido de INEGI : <https://www.inegi.org.mx/temas/estructura/>
- Jhonson, L. (1999). Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm form maximum efficiency. *Theriogenology*, 52(1), 1323-1341.
- Kamal, R. (2003). Plants for males fertility regulation. *Phytotherapy research*, 17(1), 579-590.
- Karabinus, D. (2009). Flow cytometric sorting of human sperm MicroSort clinical trial update. *Theriogenology*, 71(1), 74-79.
- Karabinus, D. S. (2014). The effectiveness of flow cytometric sorting of human sperm (MicroSort®) for influencing a child's sex. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1-12.
- Kouamo, J. (2014). An Overview of Sex Selection at Conception in Mammals. *Iranian Journal of applied animal science*, 4(3), 463-476.

- Martínez, M. A. (2013). Gametogenesis: formación del espermatozoide y del ovocito. En S. M. Martínez, *Embriología humana y biología del desarrollo* (pág. 575). Ciudad de México: Medica panamericana .
- Moteetee, A. (2016). Medicinal plants used in Lesotho for treatment of reproductive and post reproductive problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 42(2), 1-72.
- Organization., W. H. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. World Health Organization.
- Perdue, b. C.-S. (1988). women's secrets: bases for reproductive and social autonomy in a Mexican community. *american ethnologist*, 17(45), 84-97.
- Rodríguez, D.; Herrera, E.; Arroyo, F; Vázquez M & Reyes, R. (2018) Efecto del extracto de la orquídea *P. cardiothallis* sobre espermatozoides humanos. Documento presentado en la reunión de la academia de investigación en biología de la reproducción, Puebla, México.
- Sadler, T. (2016). Gametogénesis: transformación de las células germinales en gametos masculinos y femeninos . En T. Sadler, *Embriología Médica* (pág. 408). Barcelona, España: Wolters Kluwer.
- Taboada. (2000). Immobilizing/agglutination effects of crude extract of crassulaceae plants on human sperm: screening study. *ADV CONT DELIV SYST*, 8(1), 139-143.
- Taboada, J. O. (1992). Immobilizing /agglutination effects of crude extract of crassulaceae plants on human sperm: screening study. *Adv Contracept Deliv Syst*, 8(1), 139-143.
- Talapatra, S. K. (2015). *Biosynthesis: studies with isotopically labeled precursors*. New York, United States : Springer. doi:10.1007/978-3-642-45410-3
- Umehara, T., Tsujita, N., & Shimada, M. (2019). Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexung sperm. *PLOS Biology*, 17(8), 1-24.
- Vidaurri, P. N. (2011). Inseminación intrauterina con selección de sexo: una técnica modificada de capacitación espermática sencilla, económica y efectiva. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, 4(2), 77-81.
- Waizel-Bucay, J. (2009). Antitussive plants used in Mexican traditional medicine. *Phcog Rev*, 3(5), 29-43.

Yadav, S. K. (2017). An immunological approach of sperm sexing and different methods for identification of X- and Y- chromosome bearing sperm. *Veterinary world*, 10(5), 498-504.

Anexos

A-1 Tabla de Devianza

Resultados de modelos lineales generalizados mixtos con error de distribución Binomial en tablas de devianza.

Hojas

Término	gl	ji ²	P	%
Tratamiento	2	0.2065	0.9019	0.0378
Error	26	545.72		99.9615
Total	28	545.93		

Raíz

Término	gl	ji ²	P	%
Tratamiento	2	0.624	0.732	0.1141
Error	26	545.91		99.8883
Total	28	546.52		

Movilidad

Término	gl	ji ²	P	%
Tratamiento	2	80.042	<0.001	31.0156
Error	26	218.06		84.4964
Total	28	258.07		

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z	value	Pr(> z)
Hoja - control == 0	0.80900	0.09827	8.232	<1e-04	***
Raíz - control == 0	0.72856	0.09847	7.399	<1e-04	***
Raíz - hoja == 0	-0.08043	0.09427	-0.853	0.67	

A-2 Instrucciones para la recolección de una muestra de semen por el donador.



LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN

- **Recolección de muestras de semen humano.**

La recolección de las muestras de semen es importante para un buen análisis seminal, por ello es necesario cubrir una serie de pasos que nos permitan obtener un buen resultado.

- **Instrucciones para pacientes.**

- A. Abstinencia sexual de 2 a 7 días.
- B. Efectuar lavado genital con agua y jabón.
- C. Colocar la muestra por masturbación.
- D. Depositar la muestra de semen en un recipiente de polipropileno estéril.
- E. Si la muestra es colectada desde su hogar: entregar al laboratorio con un máximo de 1 hora después de haber sido colectada y mantenerla lo más cercano a temperatura corporal.

- **Abstinencia sexual.**

El tiempo de abstinencia es importante ya que tiene una gran influencia sobre la concentración espermática. El tiempo requerido de abstinencia es de 3 a 7 días.

- **Recipientes colectores.**

Los frascos de polipropileno con tapa de rosca de polietileno con capacidad de 100 ml son los óptimos para la recolección de la muestra. De preferencia el frasco debe estar tibio para tratar de mantener la temperatura ideal de la muestra (37°C).

- **Recolección de la muestra.**

La masturbación es el único método aceptado para la recolección de semen por ser el único que permite la colecta completa y limpia de contaminación. Muestras incompletas deben rechazarse ya que el análisis no reflejara el total del eyaculado.



A-3 Formato del cuestionario para donadores de semen

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Cuestionario para donadores voluntarios

Nombre		
Edad:	Estatura:	Peso:
Ocupación:		
Estado civil:		
Hijos:		
Antecedentes genéticos (Esterilidad, Diabetes, Hepatitis, Cáncer):		
Alergias (tipo y tratamiento):		
Drogas (Tipo y frecuencia):		
Bebidas alcohólicas (Frecuencia):		
Tabaquismo (Frecuencia):		
Actividades diarias (escuela, trabajo, ocio):		
Patrones de sueño (insomnio, apnea):		
Estrés (factores):		
Días de abstinencia:		



A-4 Consentimiento informado para la donación de muestras de semen

Consentimiento Informado para la donación de semen del proyecto “Efecto de la infusión de *Pluerothallis cardiothallis* sobre la separación de espermatozoides humanos por su carga genética X y Y”.

El donante: _____ con edad:

_____ y teléfono: _____

Donante:

- I. La donación es de forma libre y voluntaria por parte del donante.
- II. El uso de la(s) muestra(s) no tendrá efectos adversos ni benéficos, ya que no se usará para usos médicos y/o reproductivos.
- III. Se compromete a las donaciones requeridas respetando los días de abstinencias y horarios acordados posteriormente.
- IV. Se compromete a informar de cualquier cambio en su estado de salud especialmente si este afecta como donante.

Investigador:

- I. La donación se mantendrá anónima y los datos referidos al donante serán custodiados en el anonimato, por el laboratorio de biología de la reproducción de la Facultad de ciencias biológicas de la BUAP.
- II. No se oculta ni se cambia ninguna información solicitada para este proyecto y por lo tanto certifica su veracidad.
- III. Tiene derecho a conocer los resultados de la espermatobioscopia, así como del proyecto a realizar.
- IV. En caso de incumplimiento a las normas o por cambios en su estado de salud que impidan realizar donación será dado de baja como donante y por consiguiente no tendrá acceso a los resultados del proyecto.
- V. En caso de incumplimiento por parte del tesista estará en su derecho de cancelar las donaciones, prohibir el uso de los datos obtenidos de sus donaciones y reportarlo con el jefe en turno del laboratorio de biología de la reproducción de la Facultad de ciencias biológicas.
- VI. El tratado de la información se elaboró siguiendo los lineamientos de Helsinki de 1989 para el manejo de muestras humanas.

Nombre y firma del donante



A-5 Formato del reporte de la espermatobioscopia.

Análisis del semen humano con base en los parámetros de la OMS

ANDROLOGÍA ANÁLISIS DE SEMEN

Paciente: _____ Edad: _____ Fecha: _____

Valores de referencia de acuerdo con el Manual de la OMS para el examen de semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Editorial Panamericana, 5ta edición, 2010.

ANÁLISIS MACROSCÓPICO		
		VALORES DE REFERENCIA
Días de abstinencia:		3-7
Aspecto:		Normal (blanco, gris blanco opalescente o ligeramente amarillenta) Anormal (colores distintos)
Licuefacción:		15 a 60 minutos
Viscosidad:		Normal (gotas definidas) Disminuida (consistencia de agua) Aumentada (filancia >2 cm)
Volumen:		>1.5 ml
pH:		7.2-8
ANÁLISIS MICROSCÓPICO		
Motilidad		
A:		
B:		
C:		
A + B:		≥ 40 %
Concentración:		≥ 15 x 10 ⁶ células. /mL
Concentración Total:		≥ 39 x 10 ⁶ células. /mL
Vitalidad		≥ 58 %
Aglutinación		< 5 %
Agregación		< 5 %
Otras células		
Leucocitos:		-
Eritrocitos:		- < 5 céls/campo
Céls. Epiteliales:		-
Céls. Germinales:		-
Detritus Celulares:		- Escasa (+)
Bacterias:		- Moderadas (++) - Abundantes (+++)
Morfología		
Normales:		
Anormales:		≥ 4 %
Defectos de cabeza:		
Defectos de pieza media:		
Defectos de flagelo:		

Observaciones: _____
Diagnóstico del Laboratorio: _____

A-6 Soluciones

Ciclo Celular por tinción con DAPI

Ciclo Celular por tinción con DAPI

- 1.- Colectar la muestra, dejar en baño maría hasta el rompimiento del coagulo espermático
- 2.- Agregar 3 ml de PBS, homogenizar la muestra llevándola a vortex y agregar 3 ml de PFA al 4%, se deja reposar por 10 minutos a 37°C
- 3.- Resuspender agregando 10 a 12 ml de PBS para diluir el PFA y llevar a centrifuga a 1500 rpm/10 minutos
- 4.- Se decanta el sobrenadante y se resuspenden en 10 ml de PBS y se homogeniza la muestra llevándola a vortex
- 5.- Se agregan 2 gotas de ácido de sodio al 100x para conservar la muestra
- 6.- Se toman 100 µl de muestra y se añaden 2 ml de etanol o metanol
- 7.- Se deja incubar por 1 hora a -20°C
- 8.- Se lleva a centrifuga a 1500 rpm/10 minutos
- 9.- Decantar el precipitado y agregar 500 µl de DAPI y llevar a vortex para homogenizar la muestra.
- 10.- Dejar incubar por 30 minutos a 37 °C
- 11.- Se lleva a leer en citómetro

Preparación de Paraformaldehyde (PFA)

Se elaboró el PFA (paraformaldehyde) a una concentración al 4% donde se agregaron 4 gramos en 100 ml de agua destilada, se llevó a una temperatura de 60°C con agitación constante para la homogenización de esta, tras alcanzar la temperatura anterior se agregaron 3 gotas de NaOH (Hidróxido de sodio (90 µl)) para estabilizar la solución.

Preparación de Buffer de Fosfatos Salino (PBS)

Sal	Concentración (mmol/L)	Concentración (g/L)
NaCl	137	8.00
KCl	2.7	0.20
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	8.1	1.44
KH ₂ PO ₄	1.76	0.24
pH	7.4	7.4

Para 1L de 1X PBS:

1. Iniciar con 800 ml de agua destilada
2. Agregar 8g de NaCl
3. Agregar 0.2g de KCl
4. Agregar 1.44g de Na₂HPO₄
5. Agregar 0.24g de KH₂PO₄
6. Ajustar el pH a 7.4 con HCl
7. Agregar agua destilada hasta obtener un volumen total de 1L