



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Análisis de Factores Peri-Concepcionales que  
Influyen en la Proporción del Sexo en el Ratón

**D. Ricardo Alonso Laguna Barraza**

**2014**



*Esta tesis fue financiada con una beca del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación (MAEC) a través de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECID).*

*Y gracias a la ayuda del Proyecto del Plan Nacional de I+D+i AGL2012-39652-C02-01*



# Índice



<b>Listado de Abreviaturas.....</b>	<b>V</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>IX</b>
<b>Summary.....</b>	<b>XV</b>
<b>Revisión bibliográfica.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
¿Qué es la proporción sexual?.....	4
<b>Tipos de proporción del sexo</b>	
Proporción primaria del sexo.....	4
Proporción secundaria del sexo.....	5
Proporción terciaria del sexo.....	5
Proporción cuaternaria del sexo.....	5
Teorías acerca de la divergencia de la proporción del sexo.....	5
<b>Factores que influyen en la distorsión de la proporción del sexo: concordancias y conflictos a cerca de la aceptación de la hipótesis de Trivers y Willard .....</b>	<b>9</b>
Condición corporal de la madre.....	9
Nutrición materna y glucosa.....	10
Tamaño de camada y placentación.....	16
Factor Hormonal: hormonas esteroideas, grado de dominancia, posición uterina y tiempo de inseminación.....	18
Velocidad de desarrollo.....	23
Factor paterno.....	24
Edad parental.....	25
Otros tipos de factores.....	26
<b>Objetivo General y específicos.....</b>	<b>29</b>

<b>CAPÍTULO I.</b> Influencia del factor paterno en la proporción primaria y secundaria de sexos: selección y maduración espermática, motilidad intrauterina y capacidad fecundante del espermatozoide portador del cromosoma “X” e “Y” .....	33
<b>CAPÍTULO II.</b> Efecto de la restricción de alimento durante el periodo periconcepcional y la diabetes químicamente inducida en la proporción de sexos y tamaño de camada considerando la bilateralidad.....	51
<b>CAPÍTULO III.</b> Distribución de las implantaciones fetales en hembras ovariectomizadas, en relación con la proporción de sexos de acuerdo a la lateralidad del oviducto o cuerno uterino de origen.....	81
<b>CAPÍTULO IV.</b> Calidad embrionaria en función de la velocidad de desarrollo preimplantacional y proporción de sexos.....	105
<b>Discusión General</b> .....	119
<b>Conclusiones</b> .....	131
<b>Bibliografía</b> .....	135
<b>Anexos</b> .....	159

# **Listado de Abreviaturas**



<b>ACTH</b>	<i>Adrenocorticotropic Hormone</i> , Hormona Adenocorticotrópica
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ALX</b>	<i>Alloxan monohydrate</i> , Alozano
<b>ASD</b>	<i>Autism Spectrum Disorders</i> , Desórdenes en el Espectro del Autismo
<b>B</b>	Blastocisto
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> , Albúmina de Suero Bovina
<b>BOEC</b>	<i>Bovine Oviductal Epithelial Cells</i> , Células epiteliales oviductales bovinas
<b>B6</b>	Cepa de ratonas consanguíneas
<b>CASA</b>	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i> , Análisis de los espermatozoides asistido por ordenador
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic Adenosine MonoPhosphate</i> , Monofosfato cíclico de Adenosina
<b>CD1/C3B6F1</b>	Cepas de ratones no consanguíneas
<b>CT</b>	Tiempo del ciclo
<b>DAG</b>	Distancia ano-genital
<b>DLD</b>	<i>Developmental Language Disorder</i> , Problemas en el Desarrollo del Lenguaje
<b>dNTP</b>	<i>Deoxynucleotide</i> , deoxinucleótidos fosfatados
<b>eCG</b>	<i>Equine chorionic gonadotropin</i> , Gonadotropina Coriónica equina
<b>EGA</b>	<i>Embryonic Genome Activation</i> , Activación del Genoma Embrionario
<b>eRh</b>	Ayuno en periodos de superovulación
<b>exB</b>	Blastocisto expandido
<b>FIV</b>	Fecundación <i>In Vitro</i>
<b>FSH</b>	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> , Hormona Folículo-estimulante
<b>GH</b>	<i>Growth hormone</i> , Hormona de Crecimiento
<b>GLUT4</b>	<i>Glucose Transporter 4</i> , Transportador de Glucosa 4
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i> , Hormona Liberadora de Gonadotropinas
<b>hCG</b>	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i> , Gonadotropina Coriónica Humana
<b>HIF3</b>	<i>Hypoxia-Inducible Factor 3a</i> , Factor 3a Inducible por Hipoxia
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , Antígeno Leucocitario Humano
<b>HTF</b>	<i>Human Tubal Fluid</i> , Fluido Tubárico Humano
<b>H2az</b>	Histona 2az
<b>ICSI</b>	<i>IntraCytoplasmic Sperm Injection</i> , Inyección intracitoplasmática de un espermatozoide
<b>IGF1</b>	<i>Insulin like growth factor-1</i> , Factor de crecimiento similar a la insulina 1
<b>IGFBP-1</b>	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1</i> , Proteína de unión 1 a Factores de Crecimiento similar a la Insulina
<b>INIA</b>	Instituto Nacional de Investigación Agraria
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>KSOM</b>	<i>Potassium Simplex Optimized Medium</i> , Medio optimizado con potasio suplementado con aminoácidos
<b>LH</b>	<i>Luteinizing Hormone</i> , Hormona Luteinizante
<b>LMC</b>	<i>Local Mate Competition</i> , Competición Local por el apareamiento
<b>LRC</b>	<i>Local Resource Competence</i> , Competencia Local por el Recurso
<b>LRE</b>	<i>Local Resource Enhancement</i> , competición por el recurso

<b>mARNs</b>	Ácidos Ribonucleicos mensajeros
<b>MCI</b>	Masa celular Interna
<b>Min</b>	Minutos
<b>M2</b>	Medio de mantenimiento y lavado
<b>(M+H)</b>	Transferencia proporcional de machos y hembras
<b>oligo-dT</b>	Oligonucleótidos con colas de timina
<b>Osgin2</b>	<i>Oxidative Stress Induced Growth Inhibitor Family member 2</i>
<b>OVX</b>	Ovariectomía
<b>OVX-D</b>	Ovariectomía unilateral derecha
<b>OVX-I</b>	Ovariectomía unilateral izquierda
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PGD</b>	<i>Pre-Gestational Diagnosis</i> , Diagnóstico Pre-Gestacional
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PPAR</b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> , Receptor Activador de la Proliferación de Peroxisomas
<b>Pou5f1</b>	<i>Octamer-binding Transcription Factor 4</i> , también conocido como <i>Oct4</i>
<b>PUFAs</b>	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> , ácidos grasos poli-insaturados
<b>RH</b>	Ritodrine Hydrochloride
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
<b>R/M/L</b>	Rápido/Medio/Lento
<b>R<sub>3-4</sub></b>	Ayuno pre-implantacional
<b>Seg</b>	Segundos
<b>SEM</b>	Promedio del error estándar
<b>SOF</b>	<i>Synthetic oviductal Fluid</i> , Fluido oviductal sintético
<b>SOV</b>	Superovulación
<b>Spz</b>	Espermatozoides
<b>tB</b>	Blastocisto temprano
<b>TE</b>	Trofectodermo
<b>TWH</b>	<i>Trivers and Willard Hypothesis</i> , Hipótesis de Trivers y Willard
<b>UI</b>	Unidades Internacionales
<b>VV</b>	<i>In vivo</i>
<b>X-EGFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein in chromosome "X"</i> , Proteína verde fluorescente unida al cromosoma "X"
<b>0H</b>	Sin hermana hembra adyacente
<b>0M</b>	Sin hermano macho adyacente
<b>1H</b>	1 hermana hembra adyacente
<b>1M</b>	1 hermano macho adyacente
<b>2H</b>	2 hermanas hembras adyacentes
<b>2M</b>	2 hermanos machos adyacentes
<b>7F/2</b>	Dieta de una semana con mitad del alimento promedio ingerido por ratona
<b>8RF</b>	Dieta de 8 días intermitentes de comida y restricción
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μg/mL</b>	Microgramos por mililitro
<b>°C</b>	Grados centígrados

# Resumen



---

La proporción de sexos está distribuida de forma equilibrada en la mayor parte de las especies, y generalmente está determinada por el sexo heterogamético. En mamíferos, los ovocitos producidos por las hembras mantienen siempre la misma carga cromosómica sexual (cromosoma “X”), y son los machos, con una dotación cromosómica distinta en sus gametos (cromosomas “X” e “Y”) los que determinan el sexo. Durante la espermatogénesis se produce igual cantidad de gametos portadores del cromosoma “X” e “Y”, por lo que la probabilidad de tener una cría macho o una cría hembra por cada evento de fecundación en especies monotocas o politocas sería del 50%. Sin embargo, los datos obtenidos por los registros en muchas especies nos muestran que no siempre la proporción de los sexos es equilibrada al 50%.

Aunque se ha demostrado que de forma general todas las poblaciones espermáticas en mamíferos analizadas, aportan el mismo número de espermatozoides con los cromosomas “X” e “Y” (Johnson et al. 1989), esto no significa que estos dos tipos de espermatozoides tengan la misma probabilidad de fecundar, ya que si existieran diferencias en su maduración, motilidad/viabilidad, o capacitación/reacción acrosómica, podrían tener distinta probabilidad de fecundar. Por ejemplo el cromosoma “X” tiene más ADN que el cromosoma “Y” por lo que es de esperar que existan diferencias de masa y peso entre espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y”. Hay que tener en cuenta que el proceso de fecundación es un largo y tortuoso camino donde existen numerosos factores de selección espermática que pudiera afectar de distinta forma a cada población espermática; tales como el pH del tracto reproductor femenino, los fluidos uterinos y oviductales, la respuesta inmunológica del tracto reproductivo, la respuesta hormonal, etc. Por ejemplo se ha publicado que la proporción de machos y hembras en el momento de la fecundación en humanos puede ser cercana a 170 machos por 100 hembras (Pergament et al. 2002). Sin embargo existe controversia en este punto, ya que otros autores han reportado en otras especies un equilibrio entre estas dos poblaciones espermáticas al llegar al lugar de fecundación (Guttenbach et al. 1997, Barczyk 2001).

Existen otros mecanismos ligados a la hembra, que también podrían influir en la proporción de sexo y que podrían afectar tanto al ovocito, como al cigoto y/o al embrión. Por ejemplo, se ha reportado que el grado de madurez ovocitaria para ser fecundado afecta la proporción de sexos; se ha visto también que en muchos casos, la pérdida embrionaria por disponibilidad de nutrientes, el espacio físico de implantación,

problemas de impronta genética, desórdenes epigenéticos, cambios hormonales y medioambientales de la madre gestante, podrían afectar de distinta forma a los embriones en función de su género. En suma, debido a que los embriones de distinto sexo tiene claras diferencias genéticas y epigenéticas (Bermejo-Alvarez et al. 2008) podrían responder de distinta forma a las condiciones externas durante el periodo peri-implantacional, por lo que el estatus materno podría influir en la supervivencia de los embriones y fetos, produciendo alteraciones en la proporción de sexos. Por ello muchas de las teorías evolucionistas de la selección de sexo parten del estudio de la condición materna, sus mecanismos intrínsecos y los factores externos que la condicionan para asegurar el futuro éxito reproductivo.

En la literatura se han descrito muchos factores que podrían tener influencia directa o indirecta en el desequilibrio de la proporción de sexos. A pesar de ello, hasta la fecha se desconocen con precisión los mecanismos por los cuales se produce este fenómeno. La presente tesis propone analizar distintos factores y posibles mecanismos que pueden estar relacionados con la proporción de sexos. En el capítulo I analizamos la capacidad fecundante de espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y”. En nuestro estudio, utilizamos un modelo ratón transgénico que posee una secuencia marcadora integrada en el cromosoma “X”, y hemos analizado en primer lugar la posible distorsión primaria y secundaria del sexo debida a la presencia del transgén. Así como la calidad embrionaria medida en número de células del blastocisto. Posteriormente hemos determinado si existe una relación entre el método de selección espermática y/o la maduración espermática y la capacidad fecundante de espermatozoides portadores del cromosoma “X” e “Y”. Se observó que esta modificación genética, no alteraba las proporciones primaria ni secundaria de sexos, ni el número celular de embriones pre-implantacionales, y debido a ello, consideramos el factor transgénico como no determinante en la proporción de los sexos. En consecuencia, utilizamos los transgénicos en el resto de experimentos de los capítulos II, III y IV. Sin embargo, se observó que el origen de los espermatozoides usados en condiciones *in vitro* (epidídimo o conducto deferente) afecta la proporción de sexos, y que cuando se inhibe el movimiento uterino mediante el *ritodrine hydrochloride*, se advierte en ciertas circunstancias una alteración de las proporciones observadas en condiciones naturales, indicando que el origen espermático y la motilidad del tracto

---

genital femenino pueden ser importantes para producir las alteraciones de las proporciones de sexo observadas.

En el capítulo II se analizaron algunos factores que afectan la proporción del sexo que están modulados por la madre, como son: el estrés nutricional producido por ayuno o por estar en condiciones de hiperglucemia debido a sufrir una diabetes (en nuestro caso inducida químicamente). Analizamos el efecto de la dieta durante los periodos de pre-implantación y post-implantación, tomando en consideración la lateralidad (origen ovárico o uterino). Se encontraron diferencias de proporción del sexo cuando se registraron los datos del lado de procedencia (derecho o izquierdo), principalmente en estadios cercanos al momento de la fecundación, y en ratonas de menor constitución física. Estas diferencias se correlacionan con la pérdida embrionaria y dejan de ser significativas cuando se observaban estas proporciones de manera global.

En el capítulo III, debido a los resultados relacionados con lateralidad mostrados en el capítulo II, se realizaron ovariectomías unilaterales, tanto derecha como izquierda, y se estudiaron las relaciones que existen entre la ovariectomía y la compensación hormonal ovárica, la proporción del sexo y la posición adoptada en el útero por cada uno de los sexos. No se encontraron diferencias en las proporciones de machos y hembras entre las hemi-ovariectomías derecha e izquierda. Sin embargo los resultados muestran una preferencia de las hembras a implantar en secciones uterinas cercanas al cérvix, siendo estas hembras de un peso inferior al resto de hembras implantadas en otras secciones del útero.

Por último, en el capítulo IV, se analizó si existía una relación entre la velocidad de desarrollo pre-implantacional (segunda división mitótica embrionaria y posterior desarrollo a blastocisto) y la calidad y el sexo de los embriones producidos *in vivo*. Se sabe que el cultivo *in vitro* afecta a la velocidad de desarrollo de los embriones, siendo generalmente los embriones machos los que se desarrollan más rápido que las hembras. Nuestros resultados no indican una diferencia de la proporción del sexo en los embriones recuperados en el paso de 2 a 3 células, ni tampoco en la velocidad de desarrollo a blastocisto. Solamente se observó una mayor proporción de hembras en los embriones que más lentamente se dividían a 3 células y posteriormente tardaban más en llegar al estadio de blastocisto. También se observó una relación entre la calidad

embrionaria definida por la expresión de marcadores de pluripotencia y la velocidad de división pre-implantacional.

# Summary



Sex ratio is equally distributed in most species, and it is generally determined by the heterogametic sex. In mammals, oocytes produced by females always keep the same chromosomal sex (chromosome “X”); however, the males, with a different chromosome in their gametes (chromosomes “X” and “Y”) determine the sex. During spermatogenesis, equal number of gametes carrying the chromosome “X” and “Y” is produced. According to Mendelian’s genetic, the chance of breeding a male or a female pup per fertilization event in polytocous and monotocous species would be 50%. However, the data obtained in many species show that not always the sex ratio is balanced at 50%.

Although it has been shown that, in general, all sperm populations in mammals analyzed provide the same number of sperm with “X” and “Y” chromosomes (Johnson et al. 1989), this does not mean that these two types of sperm have the same probability of fertilizing, because if there were differences in their maturation, motility / viability, or training / acrosome reaction, they may have different probability of fertilizing. For example the “X” chromosome has more DNA than the “Y” chromosome, so it is expected that there are differences in mass and weight between sperm carrying chromosome “X” or “Y”. Taking into consideration that the fertilization process is a long and winding road where numerous sperm selection factors may affect differently each sperm population; such as pH in the female reproductive tract, uterine and oviductal fluids, the immune response in the reproductive tract, the hormonal response, etc. For example, it has been reported that the proportion of males and females at the time of fertilization in humans can be close to 170 males per 100 females (Pergament et al. 2002). However, a controversy on this point exists, since other authors reported in other species a balance between these two sperm populations that reach the site of fertilization (Güttenbach et al. 1997, Barczyk 2001).

There are other mechanisms associated with the female, which could also influence the sex ratio, and that would affect the oocyte and the zygote and / or the embryo. For example, it has been reported that the degree of oocyte maturity for fertilization affects the sex ratio. It has also been described that, in many cases, embryonic loss due to nutrient availability, physical space of implantation, genomic imprinting problems, epigenetic disorders, hormonal and environmental changes of the pregnant mother could differently affect the embryos according to their gender. To summarize, because the embryos of different sexes have clear genetic and epigenetic

differences (Bermejo-Alvarez et al. 2008), they may respond differently to external conditions during the peri-implantation period, so that maternal status could influence the survival of embryos and fetuses, causing alterations in the sex ratio. This is the reason why many of the evolutionary theories of sex selection are based on the study of maternal condition, its intrinsic mechanisms and external factors to ensure future reproductive success.

In the literature, many factors that could have a direct or indirect influence on the imbalance of the sex ratio have been described. However, the precise mechanism by which this phenomenon occurs is still unknown. This thesis aims to analyze various factors and possible mechanisms that may be related to the sex ratio. In chapter I, the fertilization capability of sperm with chromosome bearing “X” or “Y” was analyzed. In our study, we used a transgenic mouse model that presents a marker sequence integrated in the “X” chromosome, and we first analyzed the possible primary and secondary sex distortion due to the presence of the transgene, as well as embryo quality measured by the number of cells of the blastocyst. We subsequently determined whether there is a relationship between the method of sperm selection and / or sperm maturation and fertilizing capacity of sperm carrying the chromosome “X” and “Y”. It was noted that this genetic modification did not alter the sex ratio primary or secondary, or cell number of pre-implantation embryos, and because of this, we considered the transgenic factor as non-determinant in the sex ratio. Because of this, we also used the transgenic model in experiments II, III and IV. However, it was noted that the origin of the sperm (epididymis or vas deferens) affects the sex ratio, and that when uterine movement is inhibited by the ritodrine hydrochloride, it has been shown in some circumstances an alteration of the proportions observed in natural conditions, indicating that the sperm origin and female genital tract motility are important and may produce alterations in sex ratios.

In Chapter II, some factors affecting the sex ratio that are modulated by the mother were analyzed, such as: nutritional stress produced by fasting or by hyperglycemia conditions due to diabetes (in our case chemically induced). We analyzed the effect of diet during pre-implantation and post-implantation periods, considering laterality (ovarian or uterine origin). Differences in sex ratio were found when the data of the source side (right or left) were recorded, mainly in stages near to the time of fertilization, and in mice with minor physical condition. These differences

were correlated with embryonic loss and were not significantly different when these ratios were observed globally.

In Chapter III, because of the results related to laterality shown in Chapter II, unilateral ovariectomy, right or left, were performed, and the relationship between ovariectomy and ovarian hormonal balance, sex proportion and position in the uterus for each of the sexes were studied. No differences in the proportions of males and females between the right and left hemi-ovariectomy were found. However, the results showed that females had a tendency to implant in sections close to uterine cervix, presenting a lower weight than those females implanted elsewhere in the uterus.

Finally, in Chapter IV, it was analyzed whether there was a relationship between the rate of preimplantation development (second mitotic division and subsequent embryo development to blastocyst) and the quality and sex of embryos produced *in vivo*. It is known that *in vitro* culture affects the rate of embryo development; usually male embryos developing faster than females. Our results do not show a difference in the sex ratio in embryos recovered in the 2 to 3-cells stage, nor on the rate of development to blastocyst. It was only observed a higher proportion of females in embryos that arrived to the 3-cell stage the slowest and subsequently took longer to reach the blastocyst stage. A relationship between the embryo quality defined by the expression of markers of pluripotency and by the preimplantation speed division was also observed.



# **Revisión Bibliográfica**



## INTRODUCCIÓN

El “*sex ratio*” o proporción de sexos es el término que se utiliza para denotar la relación de la cantidad de machos con respecto a las hembras en una población. La probabilidad esperada en la selección del sexo es del 50%. Sin embargo, se observa un desajuste en esta proporción en muchos estudios realizados con distintas poblaciones y grupos de especies tanto monotocas como politocas, mostrando resultados variables con respecto a la obtención de un sexo u otro, dependiendo de muchos factores como la biología reproductiva de cada especie y sus modificaciones medio-ambientales, genéticas, epigenéticas y fisiológicas. En la especie humana, siempre ha sido un importante tema de interés el definir el sexo del recién nacido. A lo largo de la historia, diversas culturas antiguas daban una importancia relevante al nacimiento de hijos varones que darían sustento a la familia, y daban la importancia de la mujer para la reproducción y manutención de la descendencia. En castas altas y en algunas culturas, la prioridad del primogénito varón incluso sentenciaba a muerte a la niña recién nacida.

Desde tiempos antiguos, varios pensadores y filósofos realizaron conjeturas sobre la determinación del sexo basadas sobre todo en coincidencias de lo observado, más que en estudios científicos rigurosos. Por ejemplo, se pensaba que los machos provenían del testículo derecho, y las hembras del testículo izquierdo; o que la determinación del sexo estaba dada por la posición final adoptada tras finalizar el coito, o ideas acerca del orgasmo como indicador a la hora de predecir el sexo. Sin embargo, en la actualidad, a pesar de conocer mucho más en detalle la fisiología reproductiva y que las técnicas moleculares están muy avanzadas, hasta la fecha los métodos para dirigir el sexo del futuro individuo, no son sencillos y se utilizan técnicas bastante intrusivas, como por ejemplo, la separación de espermatozoides “X” o “Y” por citometría de flujo, o el diagnóstico pre-gestacional (*pre-gestational diagnosis*, PGD), que ayudan a revelar el sexo del embrión antes de su transferencia. El diagnóstico pre-gestacional permite conocer el sexo del embrión de muy pocas horas de desarrollo, tan solo utilizando unas pocas blastómeras obtenidas mediante una biopsia del embrión y mediante técnicas de hibridación *In situ* o de biología molecular. Este procedimiento se utiliza para evitar enfermedades relacionadas con el sexo como la hemofilia, o problemas de aneuploidías cromosómicas, y no es de práctica común en las clínicas de

reproducción humana fuera de este contexto, debido a que en muchos países está prohibido o bien debido a conflictos éticos y a los posibles daños que pueda sufrir el embrión.

En ganadería, la producción de un determinado sexo específico, permitiría la explotación más eficiente, ya sea aprovechando el volumen corporal de un macho para la industria cárnica o del beneficio productivo lechero de las hembras. Se ha extrapolado el beneficio que brindaría el poder determinar con fiabilidad el sexo del ganado, viéndose aumentada su producción y ganancia (Seidel 2003). Por ello, actualmente se hace uso del semen sexado, principalmente en ganado bovino, pero su uso es aún muy costoso y su eficacia en las inseminaciones intrauterinas es baja.

En consecuencia, la alteración de la proporción de sexos es un tema que ha cautivado a muchos investigadores a través del tiempo, debido al hecho de poder ejercer una influencia sobre él y poder manejarlo con intereses comerciales, de conservación y para estudios evolutivos, por lo que abordar los mecanismos mediante los cuales se permite obtener un sexo determinado interesa al sector clínico, ganadero y de investigación.

### **¿Qué es la proporción sexual?**

La proporción del sexo se refiere a la cantidad de machos con respecto a las hembras que se encuentran en una población en un espacio y tiempo determinado. La proporción del sexo será positiva cuando el número de machos es superior al de las hembras, y será negativa cuando en número de machos sea menor que el de hembras.

### **Tipos de proporción del sexo**

**Proporción primaria del sexo:** Se determina cuando las proporciones entre las cantidades de machos y hembras se observan en estadios post-concepcionales y pre-implantacionales. Puede encontrarse diferencias debido al mayor éxito de fecundación

de una de las poblaciones de espermatozoides portadoras del cromosoma “X” o “Y”, o debido a pérdida embrionaria durante el desarrollo pre-implantacional.

**Proporción secundaria del sexo:** Se determina en estadios que abarcan desde la implantación hasta etapas cercanas al nacimiento. Su modificación estaría dada por pérdidas fetales por reabsorción o abortos.

**Proporción terciaria del sexo:** Tienen lugar en la vida adulta, desde que los organismos son reproductivamente activos, hasta la pubertad.

**Proporción cuaternaria del sexo:** En la vida adulta post-reproductiva hasta la muerte.

### **Teorías acerca de la divergencia de la proporción del sexo**

Sabemos según las teorías evolutivas de Charles Darwin que aquellos seres que sobreviven y se adaptan mejor a las condiciones desfavorables y adversas, son aquellos que consiguen a su vez un mejor éxito reproductivo debido a que segregarán y afianzarán mejor sus genes en la descendencia. En su obra “*The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex, en 1871*”, Darwin notó que los padres realizaban un mismo esfuerzo en la generación de hijos e hijas, por lo que consideraba que la proporción del sexo tendría que estar ajustada por la selección natural (Darwin 1871). En los estudios sobre la distorsión del sexo, muchas teorías evolucionistas sugieren que los padres demandan una inversión energética para mejorar la condición de su descendencia y posteriormente tener un mayor éxito reproductivo a través del tiempo (Darwin 1871 , Fisher 1930 ). Fisher postulaba que los padres convergen en una proporción del sexo evolutivamente estable donde la inversión en machos y hembras es igual (Fisher 1930).

Hamilton en 1967 hizo un postulado sobre el éxito reproductivo y planteó la hipótesis sobre la existencia de una competencia entre los machos por el apareamiento. Observó que existía una variación en la proporción del sexo en las avispas, donde se generaban mayor cantidad de hijas. Además los nacimientos se producen muy cercanos al lugar donde se dan los cruzamientos, lo que establece una competencia local por el apareamiento por parte de los machos hermanos, de manera que los padres invertirían mayor cantidad de recursos en producir más hembras (Hamilton 1967). Posteriormente, Clark generalizó esta hipótesis por una competencia por el recurso (RC), por lo que la

competencia estaría dada por el sexo que se quedaría en la zona donde se encuentra el recurso (filopatría). En este caso, las camadas se inclinan a tener más hembras cuando el recurso es abundante en la zona; y cuando hay escasos de recurso la balanza se inclinaría a favor de los machos (Clark 1978). Este mismo fenómeno se observó en ciertos primates (*bush babies*), análogamente a la competición local por el apareamiento. Clark sugirió que las hembras entraban en competencia por el recurso y que los padres invertirían por ello más en sus hijos errantes (Frank 1990).

Una importante diferencia entre la competencia local por el apareamiento y la competencia local por el recurso, se da en que en la primera la competencia se da entre hermanos que luego se cruzan con sus hermanas generando endogamia; en cambio en la competición local por el recurso compiten entre las hermanas o incluso entre madres e hijas, pero los machos pueden tener otra procedencia por lo que se trata en este caso de cruces no consanguíneos (Clutton-Brock e Iason 1986).

Trivers y Willard postularon que las madres de buena condición corporal podrían invertir su estatus fisiológico en un sexo determinado que pueda asegurar el éxito reproductivo posterior, por ejemplo en especies poliginias, podrían inclinar la proporción de sexos hacia más nacimientos de machos en periodos de abundancia de recursos; y en periodos donde la condición materna es pobre se generarían mayor cantidad de hembras debido a que su inversión reproductiva es menor. En la naturaleza, se ha visto que dependiendo de esta característica, estos padres podrían dirigir y desviar el sexo de su camada de acuerdo al coste y beneficio que les generaría producir un sexo determinado. En los ciervos, ungulados monotocas, se observó que el estatus corporal, comportamiento y grado de dominancia, guardaba relación con la segregación del sexo de su descendencia, por lo que los hijos provenientes de cruces en buena condición pueden unirse a una élite de machos dominantes que a su vez fijarán sus genes de manera más eficiente a futuras generaciones (Trivers y Willard 1973). Sin embargo, las hembras con pobre condición corporal desviarán el sexo de su progenie a ser mayoritariamente hembra y así tener mayor probabilidad de éxito reproductivo futuro, por razones de coste-beneficio, ya que producir un hijo macho, demandaría una mayor inversión por parte de la madre, con el agregado que este macho tendría una condición inferior a otros machos, disminuyendo su posibilidad de cruzamiento y de afianzar “buenos” genes a sus descendientes, por lo que estos se perderían (Trivers y Willard

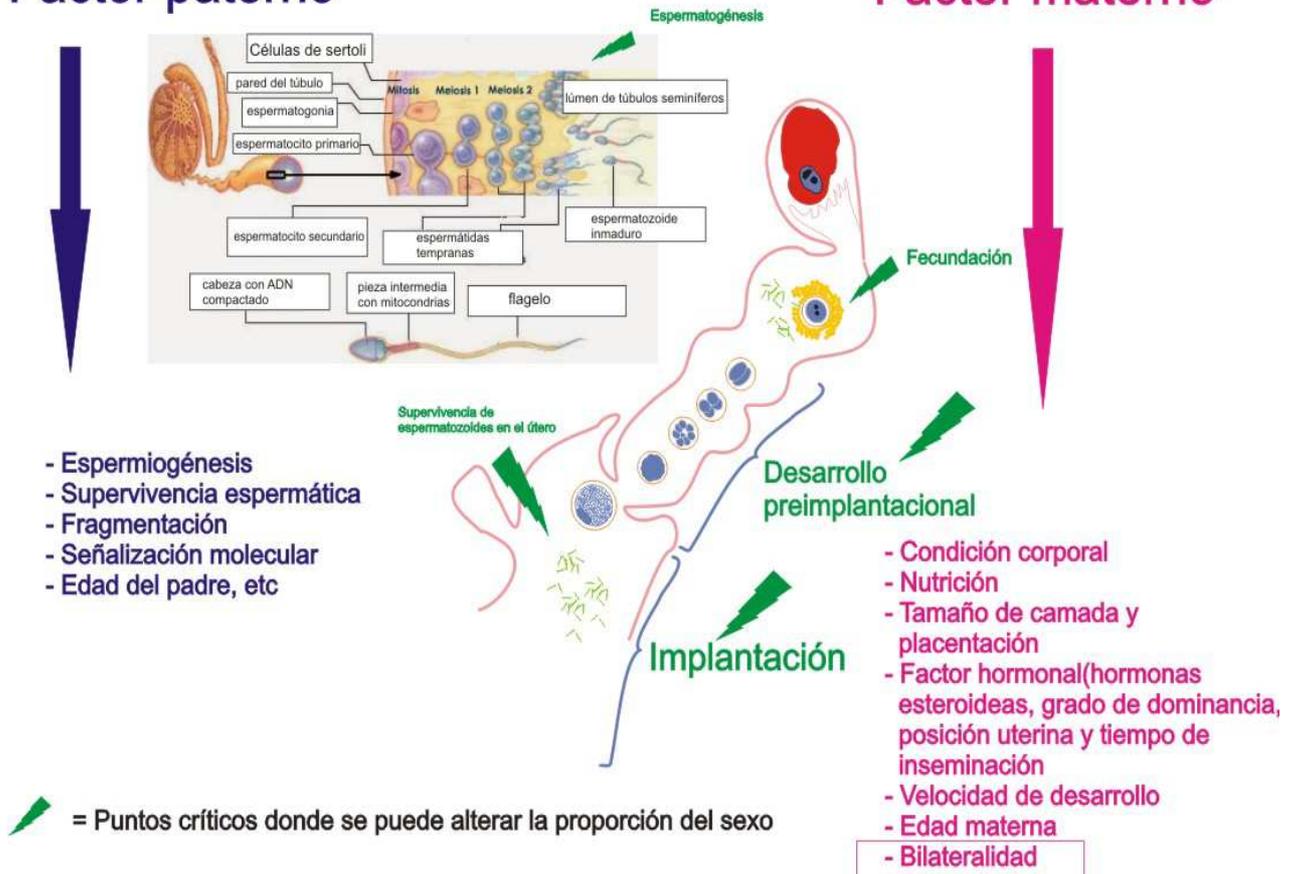
1973, Clutton-Brock e Iason 1986, Crawford 1987, Cameron 2004, Rosenfeld y Roberts 2004, Sheldon 2004).

Asimismo, en el ciervo existe una gran diferenciación sexual (siendo los machos más grandes y agresivos) y distintos grados de dominancia en ambos sexos. El éxito reproductivo puede ser mayor en aquellos que presentan mayor jerarquía (Trivers y Willard 1973, Clutton-Brock e Iason 1986, Kojola 1989, Wauters 1995, Cassinello 1996, Meikle 1996, Kruuk et al. 1999, Sheldon 2004). En esta especie con esta diferencia sexual tan marcada es donde se ha observado mejor la correlación de la distorsión de sexos (Clutton-Brock e Iason 1986, Flint, Albon et al. 1997, Kruuk et al. 1999) y posteriormente también se ha observado en otras especies como la oveja (Kent 1992, Cassinello 1996), el reno (Kojola 1989), el cerdo (Meikle 1996), otras especies de bóvidos (Roche et al. 2006), roedores (Blumberg et al.) y en la especie humana (Gibson y Mace 2003), etc.

Esta teoría toma como hipótesis que la condición materna ejerce un cambio en el estado pre-concepcional, pre-implantacional y gestacional que varía la proporción de sexos hacia machos o hembras. Se han postulado muchos factores que pudieran tener alguna influencia sobre el sistema reproductivo materno como la concentración de glucosa, los niveles hormonales, el rango de dominancia, la edad parenteral, el tamaño de camada, el orden de paridad, la placentación, los distintos tipos de dietas, el tiempo de ovulación, tiempo de fecundación, concentración de testosterona en el fluido folicular, el estrés, la estacionalidad, la lateralidad de origen, etc. (Figura 1). Esta hipótesis ha sido muy sugerente y atractiva a muchos investigadores evolucionistas y ha sido utilizada para tratar de encontrar una respuesta a este fenómeno en todas las especies de mamífero y no mamífero, siendo el sustento de estudios de meta-análisis en los cuales se encuentran variedad de resultados, muchos de los cuales concuerdan con estos postulados (Cameron 2004, Sheldon 2004).

## Factor paterno

## Factor materno



**Figura 1: Factores maternos y paternos que pueden alterar la proporción de sexos y esquema de los lugares donde puede ocurrir la distorsión. Figura modificada de (Hess y Renato de Franca 2008)**

## **Factores que influyen en la distorsión de la proporción del sexo: concordancias y conflictos acerca de la aceptación de la hipótesis de Trivers y Willard (TWH)**

### **Condición corporal de la madre**

La condición corporal es uno de los argumentos que la hipótesis de Trivers y Willard remarca como generadora de alteraciones en la proporción del sexo, ya que de acuerdo a esta condición, la inversión (energética y de recursos) de la madre hacia su descendencia será mayor o menor. Por ejemplo, el éxito reproductivo de las crías macho está fuertemente influenciado por la inversión energética de la madre antes del destete, las madres de buena condición corporal invierten más recursos en sus crías machos que en las hembras, como se ha mostrado en el ciervo rojo *Cervus elaphus* (Clutton-Brock e Iason 1986); y en el reno, *Rangifer tarandus tarandus* (Skogland 1986). En yeguas salvajes, se encontró una alta proporción de machos correlacionada con una buena condición corporal, posteriormente cuando las madres perdían esa óptima condición corporal, el porcentaje del sexo se reducía (Cameron y Linklater 2007).

Los meta-análisis realizados en diferentes especies para analizar cuáles son los factores que afectan la proporción del sexo, muestran una correlación positiva de la distorsión del sexo en favor de la teoría de Trivers y Willard cuando se asociaban al estatus corporal materno. Se ha observado que cuando se ajustó el término condición materna por el de condición corporal, el resultado de las investigaciones que apoyan la hipótesis se incrementó hasta el 74% (Cameron 2004, Roche, Lee et al. 2006). Además, los resultados de correlación positiva con la proporción del sexo se produjeron en etapas pre-concepcionales y con grados de dominancia en su comportamiento (Sheldon 2004). Otros estudios mostraron una correlación negativa (29%) o ningún efecto (43%) a la teoría de Trivers y Willard asociado a esta condición (Clutton-Brock e Iason 1986, Cameron 2004, Sheldon 2004). Sólo se observó una mejor correlación del desajuste de la proporción de sexos cuando se enmarcaron los estudios antes del nacimiento y después de la concepción (Cameron y Linklater 2007).

Sin embargo, otros estudios intentan justificar este fenómeno señalando que en ungulados la influencia sobre la proporción de sexos no estaría dada por la condición corporal materna sino que es dependiente de la densidad poblacional y muchos otros

factores medioambientales como el invierno, que podría aumentar los niveles de estrés en la madre gestante donde se producirían pérdidas embrionarias por baja fecundidad (Kruuk et al. 1999). Asimismo, en elefantes marinos se observó que a pesar que existe un dimorfismo sexual corporal entre el macho y la hembra de aproximadamente 7-8% al nacer y al momento del destete, la proporción de sexos fue similar, no presentando tampoco ningún efecto sobre la capacidad reproductiva posterior de la madre ya sea en el sexo del siguiente parto o su tasa de preñez. Debido a ello se señala que el sexo de las crías no está determinado por la edad de la madre ni tampoco por su condición corporal (Le Boeuf 1989), sugiriendo que la teoría de Trivers y Willard no sería una teoría que explicara todos los fenómenos observados, ya que se han visto muchos resultados contradictorios en la literatura donde se observan conflictos al contrastar experimentalmente los postulados sobre la segregación del sexo, y estos resultados inconsistentes han sido difíciles de interpretar (Clutton-Brock e Iason 1986, Frank 1990, Hewison 1999, Brown 2000, West et al. 2002, Wade et al. 2003, West et al. 2005). Se ha propuesto que estas diferencias de resultados estarían dadas debido a tener una baja muestra poblacional, por lo que muchos resultados son de naturaleza estocástica (Clutton-Brock e Iason 1986, Hiraiwa-Hasegawa 1993).

### **Nutrición materna y glucosa**

Muchos autores hacen referencia a la nutrición materna como papel clave en el desajuste del tamaño de camada y la viabilidad del embrión (Meikle y Drickamer 1986, Meikle y Thornton 1995, Rosenfeld, Grimm et al. 2003, Roche, Lee et al. 2006, Cameron y Linklater 2007). Los defensores de la hipótesis de la nutrición materna postulan que parece tener mayor efecto cuando los periodos de restricción de alimento son cercanos al momento de la concepción, debido a que en estudios donde se ha analizado el efecto post-concepcional, no se han apreciado cambios significativos en la proporción de sexos de las crías (Cameron 2004, Sheldon 2004). Todos estos supuestos se han usado en modelos como el ratón, la vaca, la oveja, el hámster, etc. donde han propuesto experimentos de restricción de alimento, viendo el efecto de la sub-nutrición sobre la generación de machos y hembras.

En muchas investigaciones buscan alterar las condiciones naturales del ambiente materno-embionario mediante diferentes tipos de estrés, ya sean alimenticios,

químicos, y hormonales, que afecten la proporción de los sexos. Por ello, en estudios donde se pretende causar un estrés alimentario, se somete a diversos tipos de dietas y restricción de alimento. Meikle experimentó con ratonas restringiendo el alimento y observó que los machos que provienen de madres a quienes les han restringido el alimento de forma intermitente la semana previa a la concepción, son pequeños en su vida adulta y además se altera la proporción de sexos de su descendencia produciendo muchos menos machos en comparación con aquellos que han nacido de hembras alimentadas *ad libitum* (Meikle y Drickamer 1986). Quizás este fenómeno se deba a la pérdida fisiológica de machos, en madres con alimento restringido, ajustándose estos resultados con la hipótesis de Trivers y Willard (Meikle y Thornton 1995). Además encontraron resultados similares al restringir intermitentemente el alimento antes y durante la gestación, observando que la proporción se inclinaba al nacimiento de hijas (Meikle y Thornton 1995). A diferencia de un estudio anterior donde no se observaron diferencias significativas en la proporción de sexos (Zamiri 1978).

La sub-nutrición materna puede crear disrupción en la esteroidogénesis y afectar el desarrollo de glándulas sexuales accesorias de las crías macho, posiblemente debido a que los fetos no reciben los nutrientes necesarios durante el periodo crítico de diferenciación sexual. Por ello en algunos casos, las glándulas sexuales accesorias de los machos son más pequeñas y quizás este fenómeno tenga relación con que los hijos de los controles, experimentan una mayor dominancia que los de alimento restringido (Marty et al 2003; Rehm et al., 2008). A pesar de ello, dicha subnutrición no parece tener repercusión en el almacenamiento del esperma, pero sí puede verse afectado su tamaño corporal significativamente (Hamilton 1985; Meikle y Westberg 2001). En relación a la descendencia de madres que han sido sometidas a una restricción de alimento, se ha observado una disminución en el éxito reproductivo de las hijas, así como una reducción en su proporción de sexos, obteniéndose un mayor número de hijas debido a la susceptibilidad de los machos por este estrés (Labov 1986; Meikle y Westberg 2001; Rosenfeld et al. 2003). Sin embargo, otros autores no aseguran que la descendencia de madres con alimento restringido presente una desventaja reproductiva (Krackow 1993).

Por otro lado, muchos estudios demuestran que la presencia de macro y micronutrientes son de especial importancia en la madre cuando se encuentra gestante y que la falta de alguno de estos nutrientes tiene influencia sobre el desarrollo del feto o

de la placenta, por lo que podría desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la vida adulta y afectar la proporción de sexos (McMillen y Robinson 2005). Determinados azúcares o derivados (como los polioles esenciales en la ruta de las pentosas fosfato), pueden ejercer importantes efectos a medio y largo plazo en el desarrollo embrionario, sobre todo en los primeros meses de gestación (Jauniaux et al. 2005). La condición materna y el mantenimiento de los niveles de glucosa en concentraciones normales son importantes para el desarrollo del feto (Symonds et al. 2007), altas concentraciones de polioles y azúcares en el medio de cultivo de ratas desarrollan anomalías congénitas en el desarrollo fetal (Hod et al. 1986). Además parecen ser más relevantes determinados nutrientes para el proceso embrionario que para el fetal, como la fructosa, que es un precursor del poliol sorbitol, fundamental para mantener los tejidos embrionarios y regular el balance de óxido-reducción de las pirimidinas nucleotídicas (Jauniaux et al. 2005). Asimismo cuando se altera la dieta normal, hay probabilidades de alterar la ingesta de otros micronutrientes como el alfa tocoferol (vitamina E), la cual puede modificar el suministro de glucosa materna y fetal en el plasma (Roxborough et al. 2000).

En ovejas y ratas el cambio metabólico experimentado por la dieta, debido a la restricción total, parcial o alternativa de alimento o al experimentar cambios en su contenido en carbohidratos al momento de la gestación, modifica la homeostasis de la glucosa materna por los cambios en la presión sanguínea y contenido de cortisol. Estos cambios metabólicos también podrían generar diabetes en adultos, hiper-insulinemia y tejidos resistentes a la acción de la insulina. Por lo que se obtendría como resultado una menor cantidad de nacimientos, y crías de bajo peso (Simonetta et al. 1991, Edwards y McMillen 2001, Fernandez-Twinn et al. 2003).

La restricción de alimento lleva a cambios en la fisiología del organismo, activando rutas biosintéticas distintas y decreciendo en el útero la actividad glicerofosforil colina diesterasa, disminuyendo el rango de concentración de sodio y potasio (Mitra y Chowdhury 1989). Además conlleva a cambios en el fenotipo de las crías, los machos y las hembras son más pequeños que aquellos que provienen de madres control *ad libitum* (Meikle y Thornton 1995, Meikle y Westberg 2001). También se ha observado que las dietas bajas en nutrientes permiten que el cuerpo sintetice menor cantidad de corticosterona materna, por lo que el embrión puede desarrollar problemas en el sistema cardiovascular y bajos niveles de presión sanguínea

(Edwards y McMillen 2001). Además hay que tener en consideración que al restringirles el alimento, también se les está restringiendo el consumo de ácidos grasos esenciales, lo cual ha sido considerado como la causa de una baja proporción de machos y pequeños tamaños de camada en roedores. (Lane 1973, Moriya y Hiroshige 1978, Zamiri 1978, Meikle y Drickamer 1986, Pratt y Lisk 1989, Meikle 1995, Krackow 1997). Otros estudios remarcan la importancia que tiene la sustitución alimentaria por alimento de mayor o menor aportación energética, o reflejan las fuentes calóricas que se tienen en la dieta y que modifican la proporción de los sexos en la descendencia, se ha visto en ratones que ante una dieta alta en energía se obtuvo en los nacimientos un 75% de machos, mientras que una dieta de menor contenido energético produjo un 46% de machos (Rosenfeld et al. 2003).

Cuando se dieron dietas altas en contenido calórico y bajas en proteínas a ratas gestantes, las dietas bajas en proteína generaron episodios de hiperglucemia materna, induciendo apoptosis de la masa celular interna, que desencadenaron en cambios fisiológicos a mediano o largo plazo en su descendencia (Armitage 1987, Kwong 2000, Fernandez-Twinn et al. 2003). Las ratas sometidas a dos tipos de dietas, una baja en grasa donde el aporte calórico estaba dado por algunos azúcares y carbohidratos complejos y otra alta en grasa, compuesta de grasa de cerdo, tuvieron una proporción de sexos dos veces inferior a los controles alimentados con alimento estándar; se observó también una reducción en el tamaño de camada, posiblemente debida a la alta mortalidad y susceptibilidad de los machos (Rivers 1974). En ratones se ha observado que una dieta alta en grasa generaba mayor descendencia de machos, aun cuando los contenidos calóricos eran similares a los de la dieta control (Rosenfeld et al. 2003). Por lo que parece importante el estudio del contenido de grasa en el alimento y su relación con la distorsión de los sexos (Rosenfeld et al. 2003, Rosenfeld y Roberts 2004).

Sin embargo existen otros datos contradictorios, ya que algunos autores han observado que al disminuir los niveles de grasa en el alimento, la proporción de sexos inclinó la balanza hacia el nacimiento de un mayor número de hembras en la camada (Alexenko, Mao et al. 2007). En los laboratorios Jackson siempre se usaba la misma marca comercial de alimento que contenía un porcentaje relativamente alto de grasa y contenido proteico y se hizo un estudio retrospectivo con diferentes cepas de ratones desde 1959 hasta 1966, donde se analizó si esta condición influía en la proporción de los sexos. Los resultados mostraron que no había una distorsión significativa de los sexos

(Schlager 1968). Tampoco se observó cambios significativos en la desviación de la proporción de sexos cuando se administraron dietas altas en grasa a ratonas que se cruzaron a las 10 semanas de edad. Sin embargo, cuando se realizaron los cruces después de 20, 28 y 40 semanas, se apreció un claro aumento en la proporción de machos en la dieta alta en grasa con respecto a las hembras, y por el contrario en ratonas alimentadas con menor cantidad de grasa y alta cantidad de carbohidratos, la proporción de sexos disminuyó significativamente (Rosenfeld et al. 2003, Rosenfeld y Roberts 2004, Baker 2005). Otros estudios se han centrado en crear un estrés alimentario disminuyendo la cantidad de ácidos grasos en las dietas, observando que las crías son más pequeñas y las camadas tienen una tendencia a tener más hembras (Rivers 1974, Kwong 2000). Resultó sorprendente observar que los niveles de IGF1 y corticosterona eran similares al grupo control después de una ingesta de 40 semanas, en las cuales no se creó un desajuste metabólico ni un desbalance energético (Alexenko et al. 2007).

Asimismo, en análisis realizados en humanos, se observó que al consumir mayor cantidad de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) en sus dietas, se obtuvo mayor cantidad de hijos varones (Austad S 1986, Crawford 1987). Eso estaría en acuerdo con otros estudios donde al parecer los ácidos grasos poli-insaturados proporcionados por la dieta influirían en la distorsión de la proporción de los sexos (Rosenfeld et al. 2003, Alexenko et al. 2007, Whyte et al. 2007). De forma similar, las zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) alimentadas con una dieta suplementada con sardinas, mostraron una mayor proporción de machos en las camadas, por lo que se ha sugerido la hipótesis que el alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados es el responsable de este desequilibrio (Austad 1986).

También se ha estudiado este fenómeno dando mayor énfasis en la acción de determinados ácidos grasos (Rosenfeld et al. 2003, Alexenko et al. 2007, Whyte et al. 2007). Se observó que las madres alimentadas con suplementos de ácidos grasos poli-insaturados como los Omega 6 y 3, desarrollan mayor ansiedad y estrés que los controles. Esto se ve reflejado en la construcción de los nidos y en la estereotipia de acicalar excesivamente el pelaje de sus crías, por lo que pudiera tener un resultado directo con la disminución de la proporción de sexos de la camada. Al parecer, los suplementos de ácidos grasos de Omega 6 poseen una mayor actividad para la ansiedad que los de Omega 3 (Wells 2000, Rosenfeld y Roberts 2004, Uller 2005). Tanto es así que la proporción de la distorsión de sexos es el doble de hembras que de machos

empleando suplementos de Omega 6, lo cual contradice los resultados que afirmaban que el ahorro de ácidos grasos poli-insaturados distorsionan el sexo hacia machos debido al alto contenido de ácido palmítico, esteárico y oleico (Fountain et al. 2008), como se ha observado en humanos, donde parece que el enriquecimiento de Omega 6 y sobre todo de Omega 3, tiene un efecto en producir más hombres que mujeres (Austad 1986, Crawford 1987).

También se ha observado en ratas una disminución de la proporción de los sexos en función del alto contenido de sodio, potasio y bajo contenido en calcio en el alimento (Til 1971, Bird y Contreras 1986). Además se ha reportado que otros electrolitos presentes en la dieta materna, también afectan la proporción de los sexos cuando no se encuentran en equilibrio, como se describe en un estudio realizado en humanos (Papa et al. 1983). Por ello, es lógico que la alimentación materna esté muy relacionada con lo que puede ocurrir en el ambiente uterino, debido a que sus secreciones contienen nutrientes que son esenciales para la supervivencia del embrión y el feto, con lo cual el aumento o disminución del tamaño de camada puede alterar la proporción del sexo (Carter 2007). Además, los micronutrientes son muy importantes debido a que su carencia o el exceso de estos (los cuales son donadores de grupos metilo como el ácido fólico, vitamina B12, metionina y colina) afectan a la progenie; un rasgo fenotípico claro se observa en la pérdida de coloración del pelaje (Waterland et al. 2006).

Williams y Gloster argumentaron que en la especie humana existe una correlación positiva entre la disponibilidad de alimento y las buenas condiciones maternas para el mayor nacimiento de niños (Williams y Gloster 1992). Esto se sustenta en los estudios realizados en comunidades africanas donde existe un alto grado de desnutrición, y donde se registran un mayor número de nacimientos de niñas que suelen ser más pequeñas y de poco peso (Andersson y Bergstrom 1998). Además coincide con los resultados de mujeres de etiofia de mejor constitución física, medido en parámetros de masa muscular y corporal, donde presentaban mayor cantidad de nacimientos de hijos, que aquellas que poseían menores índices de masa y músculo (Gibson y Mace 2003). De forma similar, se observaron en poblaciones italianas, que mujeres de constitución muy delgada, eran menos propensas a tener hijos varones (Cagnacci et al. 2005). Al parecer en la especie humana, los embriones macho tienen mayores requerimientos calóricos y energéticos que las hembras (Tamimi et al. 2003). De manera retrospectiva, históricamente han existido condiciones severas en las se han

sometido a muchas poblaciones a diversos factores por causa de las guerras. Por ejemplo, se observó la descendencia de una población holandesa durante la segunda guerra mundial, en periodos de hambruna, donde se redujo el número de nacimientos y de pesos de los nacidos, alterando los niveles de homeostasis glucosa-insulina. (Ravelli et al. 1998).

Existe una estrecha relación entre la nutrición y la disfunción de la glucosa como elemento modificador de la fisiología del individuo. Se asocia con la mortalidad o el estado alterado del embrión/feto y el cambio en las proporciones de machos y hembras, así como con un mayor desarrollo de los machos en medios con alto contenido de glucosa. Esto se ha observado en los topillos agrestes (*Microtus agrestis*) (Helle et al. 2008) y en ratones diabéticos (Machado et al. 2001). Asimismo, se muestra que las dietas con alto contenido de grasa presentan altos niveles de glucosa circulante (Folmer et al. 2003), y también el estrés social por la presencia de una hembra dominante aumenta los niveles de glucosa circulante (Pratt y Lisk 1989, Pratt y Lisk 1991). En ratonas diabéticas, se ha observado un retraso en su desarrollo, así como una modificación del transportador de glucosa (Diamond et al. 1989, Moley et al. 1998). Además, mujeres diabéticas dependientes de insulina, presentaron un mayor nacimiento de hijas (Rjasanowski et al. 1998).

### **Tamaño de camada y placentación**

Una diferencia importante a considerar es si las especies son monotocas, es decir que dan lugar a la gestación de un único hijo (como por ejemplo en la especie humana, la vaca, la yegua, etc.), las cuales tienen pocas crías y la gestación es mucho más larga; o por el contrario son especies politocas como la cerda, el conejo, el ratón, y otras especies de roedores que pueden albergar varias crías y son de gestaciones cortas (Symonds et al. 2007).

Se entiende que grandes tamaños de camada pueden desencadenar una restricción del espacio intrauterino, que juega en contra del número de implantaciones a desarrollar, permitiendo la pérdida fetal por reabsorciones y modificando la proporción de los sexos (Tse et al. 2008, Laguna-Barraza et al. 2012). En cobayas individualizadas, se observó que un pequeño tamaño de camada (1-2 crías) favorecía un aumento de

machos. Este efecto no se observó cuando los animales compartían jaulas, por lo que podría existir otro factor añadido como el rango de dominancia (Peaker y Taylor 1996). En cepas de ratonas salvajes, cuando se analizaban las distancias ano-genitales (DAG), aquellas que mostraban DAG grandes *a posteriori* presentaban tamaños de camada pequeños y con un mayor número de machos (Szenczi et al. 2013).

Un aspecto que acompaña al tamaño de camada, es el tipo de placentación de acuerdo a la especie. En las especies monotocas y politocas la placentación es diferente; por ejemplo, los roedores y humanos tienen una placenta discoide hemocorial, las cerdas presentan una placenta epiteliocorial; otros como la perra, gata y la loba entre otros carnívoros presentan placenta endocorial, mientras que otras especies de rumiantes como las ovejas tienen una placenta con cotiledones sindesmocorial. En cualquiera de los casos, estas placentas controlan el transporte de ciertos nutrientes y moléculas de la madre al feto (Carter 2007), y en caso de producirse un defecto en la placenta, se puede llegar a la muerte fetal que conllevaría a la posible alteración de la proporción de los sexos.

En humanos, debido a diversas patologías placentarias como desprendimiento prematuro de placenta y placenta previa, se observó un incremento de niños en la proporción de sexos, y las pacientes con “placenta accreta” y gestación extrauterina mostraban un mayor número de niñas (James 1995). Se observaron resultados similares en un estudio con pacientes del sur de Australia (Khong 1998). Por otro lado, se ha relacionado el tabaquismo durante el embarazo con las complicaciones placentarias, donde la placenta previa reducía la proporción de machos (Mortensen et al. 2001). Estos resultados son difíciles de explicar, sin embargo al parecer los niveles anómalos de hormonas esteroideas durante la concepción podrían generar estos desequilibrios (James 1995). Asimismo, el estrés prenatal condiciona la expresión de diversos agentes como el receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*), el factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGFBP-1, *insulin-like growth factor binding protein 1*), el factor 3a inducible por hipoxia (HIF3, *hypoxia-inducible factor 3a*), y el transportador de glucosa 4 (GLUT4, *glucose transporter 4*) en placentas macho, y no en hembras (Mueller y Bale 2008).

### **Factor hormonal: hormonas esteroideas, grado de dominancia, posición uterina y tiempo de inseminación**

Muchos de los factores que determinan la proporción sexual tienen relación unos con otros. Es difícil determinar si estos son causa o efecto de uno o más factores sobre el resto. Por ejemplo, la testosterona circulante tiene un efecto sobre los padres de forma diferente, que condiciona la proporción de sexos, pero además marca el grado de dominancia de la especie. Asimismo, en especies politocas, los fetos hembra que se encuentran implantados al lado de machos reciben dosis mayores de testosterona y de forma similar el macho que se encuentra entre hembras recibe distinta dosis de gonadotropinas (Clark y Galef 1988). Las hembras también pueden afectar su nivel hormonal con un exceso de gonadotropinas, que condicionan su ovulación más temprana o tardía, siendo importante este momento para cuando se realice la inseminación y la fecundación.

En relación a la concentración de hormonas esteroideas, se ha observado que en anfibios es muy marcada su influencia para cambiar de un sexo a otro, o llevarlo a estados intersexuales, como en la rana saltadora de la India (*Euphlyctis cyanophlyctis*), donde al modificar las concentraciones hormonales como el propionato de testosterona y el 17- $\beta$  estradiol (Phuge y Gramapurohit 2014) se produce este efecto de reversión del sexo. Sin embargo, esto no ocurre en mamíferos, y la forma en que las hormonas influyan sobre la proporción de sexos se da en función de las condiciones ambientales para la concepción, pre-implantación, estadios pre-natales para la supervivencia embrionaria y fetal.

Se ha propuesto que los niveles hormonales de los padres, cercanos al tiempo de concepción afecta a la proporción de los sexos (James 1980, James 1985, James 1990, James 1992, James 1995, James 1996, James 2008). Por ejemplo, altas dosis de gonadotropinas generan mayor nacimiento de hijas (James 1980), así como las altas concentraciones de testosterona paterna producen nacimientos de más hijos (James 1986). De igual manera, la presencia de caracteres masculinizantes en la madre como la distribución de la grasa corporal producto de los elevados niveles de estrógenos y andrógenos en el tiempo de la concepción, permiten tener mayor descendencia de niños (James 1990, Singh y Zambarano 1997); de forma similar en bovinos también se hace referencia a la influencia de la testosterona presente en el fluido folicular como

condicionante para la determinación de la proporción de los sexos (Grant e Irwin 2005, Grant et al. 2008). Muchos de los resultados de segregación del sexo han sido difíciles de interpretar, incluso cuando se generan en una misma madre, posiblemente debidos a que el incremento de la concentración de los niveles de hormonas durante el tiempo de concepción es muy variable (Rose et al. 1975, Mazur 1976). Además, dependiendo de las especies, parece ocurrir que en aquellas donde la fase folicular es corta, el ovocito puede ser más receptivo a determinado tipo de espermatozoide “X” o “Y”, a presentar mayor facilidad de penetrar la zona pelúcida, que en especies donde los ciclos foliculares son más largos (Mittwoch 1989, Saling 1991). En humanos se dice que la fecundación que altera la proporción de sexos se da en forma de U, con fecundaciones muy tempranas y tardías que dan ventaja al espermatozoide “Y”, por lo que se producirían más machos, que las fecundaciones intermedias, las cuales favorecerían la penetración del espermatozoide “X” obteniéndose más hembras (Pratt et al. 1987, Hedricks y McClintock 1990, Jimenez 2001).

Se ha observado que en ciclos foliculares cortos, se obtuvo más nacimientos de machos (Weinberg et al. 1995). No obstante, en un estudio multicéntrico donde se realizaban ciclos naturales, se inseminó de acuerdo a la longitud del ciclo folicular y a características que indicaban el día de ovulación (cambios en moco cervical y temperatura basal), no encontrándose distorsión de la proporción del sexo (Gray et al. 1998).

Asimismo, se ha estudiado la influencia del cuerpo lúteo en la longitud de la fase folicular de ovulaciones ipsilaterales y contralaterales y se estudió si éstas determinaban el estatus de calidad del folículo dominante siguiente. El cuerpo lúteo remanente en ciclos foliculares tempranos secreta progesterona y otra serie de factores que ejercen un efecto negativo sobre la calidad del folículo dominante y su ovocito, inhibiendo los factores de crecimiento y la producción de estradiol folicular (Fukuda et al. 1996). Si bien se asume que la mitad de las ovulaciones se dan en el ovario derecho y la otra mitad en el izquierdo, aún se desconoce el patrón a seguir de la siguiente ovulación, es decir si será ipsilateral o contralateral (Gougeon y Lefevre 1984, Werlin et al. 1986). Se ha encontrado o bien que la ovulación del lado derecho es tan frecuente como la del izquierdo (Balasch et al. 1994, Fukuda et al. 1996, Fukuda et al. 2000), o que las del lado derecho son las más frecuentes (Potashnik et al. 1987, Check et al. 1991). Además, se ha observado que los ovocitos liberados del ovario derecho tienen *a posteriori* mayor

potencial de preñez cuando en el ciclo anterior se produjo la ovulación en el lado izquierdo (Fukuda et al. 2000, Fukuda et al. 2006).

En la especie humana y hembras de monos *Rhesus*, las ovulaciones con ciclos previos inferiores a 14 días ocurrían generalmente en el lugar contralateral, mientras que en ciclos de mayor duración, la ovulación se daba en lados aleatorios (Wallach et al. 1973, Fukuda. 1996, Fukuda et al. 2000). Al parecer un ciclo folicular largo, aparece de forma frecuente cuando dos ciclos ovulatorios consecutivos se manifiestan en el mismo ovario (Wallach et al. 1973). Además el estatus del folículo dominante, parece estar influenciado por la lateralidad del folículo del ciclo anterior. Por ello en fecundaciones *in vitro* con ciclos naturales, la obtención de un embrión transferible de mejor calidad se encuentra en la ovulación contralateral, presentando el fluido del folículo dominante del lado ipsilateral altas concentraciones de andrógenos y bajas de estrógenos, las cuales son negativas para el ovocito. En una ovulación consecutiva ipsilateral, el cuerpo lúteo actúa como inhibidor, secretando factores ováricos y progesterona que disminuyen la calidad del folículo dominante. De forma general, podríamos decir que un folículo dominante maduro durante un ciclo natural, es más viable si la ovulación anterior ocurrió de manera contralateral (Wallach et al. 1973, Fukuda et al. 1996).

Por ello, el control hormonal es muy importante y muy variable en sus efectos, se ha observado que desórdenes producidos en las hormonas esteroideas afectan el sistema nervioso y pueden producir problemas en el desarrollo del lenguaje (DLD, *developmental language disorder*), donde se ha observado una significativa proporción de hermanos varones en poblaciones danesas con este problema (Mouridsen y Hauschild 2010). No observado en otros desórdenes como el autismo (ASD, *autism spectrum disorders*) donde no se observó una relación clara en la proporción de hermanos con este problema (Mouridsen et al. 2013).

En los casos donde se presenta un mayor grado de dominancia en relación al exceso hormonal (sobre todo de testosterona), se ha observado un cambio en la proporción del sexo. Por ejemplo, inicialmente la hipótesis de Trivers y Willard (TWH) se fundamenta en estudios realizados en ungulados, cuyo grado de dominancia de las hembras era alto, por ello en estos casos, estas madres poseían mayor condición corporal y mejor estatus nutricional. La hipótesis sugería que estas madres soportarían mejor el llevar a término preñeces de machos y que sus hijos heredarían un rango

superior en la lucha por la dominancia entre los demás machos (Trivers y Willard 1973, Cassinello 1996).

Se ha descrito que cuando a las jaulas de hembras de hámster se introducía una hembra con comportamiento agresivo, las hembras subordinadas presentaban mayor cantidad de crías hembra, de menor tamaño con respecto a las crías hembra de hámster de comportamiento normal. El mayor nacimiento de hembras, posiblemente se debe a la pérdida de embriones macho entre los primeros 5 y 10 días de gestación (Pratt y Lisk 1989, Bacon y McClintock 1999). Si a ratonas subordinadas se les administra dexametasona, un esteroide que inhibe el transporte de glucosa, reduce sus niveles plasmáticos y actúa con poco impacto sobre el desarrollo folicular (Hahn 1999 et al. 2001, Buren 2002), evitando el estrés producido por las ratonas dominantes, y éstas vuelven a recuperar los tamaños de camada perdida por la reabsorción de machos (Pratt y Lisk 1990).

En primates como el lémur, el estrés social experimentado permite la mayor producción de machos que hembras, ajustándose más al modelo de competición por el recurso propuesto por Clark, siendo independiente del estado nutricional de la madre (Clark 1978, Perret 1990, Hiraiwa-Hasegawa 1993, Krackow 1997). En especies de babuinos, el rango jerárquico no determina el mayor nacimiento de crías macho, sino que por el contrario nacen crías hembras, posiblemente para mantener la alta jerarquía en sus hijas y su buen rango social (Brown y Silk 2002). De manera similar se ha descrito en babuinos amarillos que las hembras dominantes (*Papio cyanocephalus*) producían 34,5% de machos en comparación con las subordinadas que tenían 68,2% de machos (Altmann 1980). Sorprendentemente esta relación también se ha observado en cerdas domésticas, donde se ha reportado que la mayor dominancia de las madres tiene un efecto sobre la mayor producción de crías hembra 59% que las hembras subordinadas 41% (Meikle 1993).

El tiempo de inseminación parece ser otro factor hormonal muy determinante en la proporción de sexos, y junto al efecto que tienen los componentes nutricionales del alimento materno, potencian su distorsión. En bovinos se ha asociado este fenómeno con la cantidad de glucosa y la fluctuación de la hormona luteinizante circulante durante la sincronización del estro (Rorie 1999, Cameron 2004). En otros estudios el tiempo de inseminación fue relevante para la distorsión del sexo cuando se hicieron en etapas muy

tempranas, y en etapas de estro tardío obteniéndose mayor nacimiento de machos, posiblemente debido a la disminución del pH vaginal ya que puede modificar en los espermatozoides, su longevidad, motilidad y capacidad fecundante (Hammond 1934, Pratt et al. 1987, Rorie 1999). Además si tomamos en cuenta el grado de maduración de los ovocitos con respecto al tiempo de inseminación *in vitro*, se observó un mayor número de individuos machos cuando la fecundación fue tardía y mayor número de hembras cuando se inseminó inmediatamente después que el ovocito extruyera el primer corpúsculo polar (Gutierrez-Adan et al. 1999). Esto se correlaciona con estudios realizados en ciervos y ovejas, donde la variación en el tiempo de inseminación temprano o tardío parece ser importante para la distorsión del sexo a favor de hembras y machos respectivamente. También se ha descrito que la duración de la interacción entre los gametos y la duración de la incubación previa de los espermatozoides antes de la fecundación producen un sesgo en la proporción de sexos en embriones bovinos (Lechniak et al. 2003). Sin embargo, en otros estudios en bovinos, estos factores no produjeron ningún efecto (Rorie 1999).

Los resultados en humanos tampoco son claros. Se ha observado que si el tiempo de inseminación es temprano, y las fases del desarrollo folicular son intermedias o tardías, unos 2-3 días antes de la ovulación, hay mayor porcentaje de niños (Harlap 1979, Martin 1997). Sin embargo estos datos se reducen si se produce la inseminación un día antes de la ovulación (Guerrero 1970). Se dice que la proporción de los sexos y el tiempo de inseminación se encuentra representada en forma de U, y eso puede ser explicado por el pico de producción de hormona luteinizante y por los niveles de glucosa circulante (Cameron et al. 2008). Settles reportó que en las etapas donde la fecundación se daba a mitad del ciclo ovulatorio, se obtenía mayor número de niños (86%) y que el modelo de fecundación relacionado a la proporción de los sexos estaría representado con la forma de una U invertida (Shettles 1970). Sin embargo, a pesar de los datos reportados, no está claro que en todos los casos el tiempo de inseminación u ovulación tengan algún efecto directo sobre el porcentaje del sexo de la descendencia.

Otro de los aspectos que llaman mucho la atención en cuanto a la influencia de las hormonas sobre la descendencia, es la posición de los fetos en el útero materno (Vandenbergh y Huggett 1994, Vom Saal 1999). Se ha observado que los fetos hembra que se encuentran entre dos machos, elevan sus niveles de testosterona, y presentan una distancia ano-genital mayor que aquellas que no se encontraban entre machos. Además

luego en la vida adulta presentan camadas de mayor proporción de machos, al parecer debido a los niveles de andrógenos, y llegan a adquirir un rol masculinizante y un carácter dominante (Grant 1994, Grant 1996, Grant y France 2001). Por el contrario cuando no se encuentran adyacentes a fetos machos, luego en la vida adulta presentan una inclinación en la proporción de sexos a tener más hijas (Vandenbergh y Huggett 1994). Y cuando una cría hembra se encontraba al lado de sólo un macho, esta producía en su vida adulta una proporción de sexos cercano al equilibrio, de igual forma ocurrió al verse la proporción de sexos en un segundo cruce (Vandenbergh y Huggett 1994).

### **Velocidad de desarrollo**

Uno de los primeros parámetros que permitieron ver las diferencias entre embriones pre-implantacionales de distinto sexo es su velocidad de división. Se observó que entre los embriones cultivados *in vitro* de rápida división generalmente se encuentra una mayor cantidad de machos que hembras. Este fenómeno ha sido observado en bovinos (Avery 1989, Avery et al. 1991, Yadav et al. 1993), murinos (Valdivia et al. 1993) y ovinos (Bernardi y Delouis 1996, Catt 1997), etc. Se ha demostrado que los embriones macho, bajo determinadas circunstancias, tienen una mayor velocidad de desarrollo que las hembras (Avery et al. 1992, Valdivia et al. 1993, Yadav et al. 1993, Cassar et al. 1994, Pergament et al. 1994, Bernardi y Delouis 1996, Tsunoda 2005). Las mayores desviaciones hacia una mayor proporción de sexos se observa en aquellos que han desarrollado más rápido hasta blastocistos y es mucho más claro cuando se analizan blastocistos expandidos y eclosionados (Xu et al. 1992, Grisart et al. 1995, Pegoraro et al. 1998, Lonergan, Khatir. 1999). Por ejemplo, en porcino se ha diferenciado si los embriones eclosionados *in vivo* son machos, en función a su mayor número de células (Cassar et al. 1994, Cassar et al. 1995, Kimura et al. 2004). Sin embargo, otros afirman que esta diferencia es mayor en los cultivados *in vitro* (Catt 1997, Pegoraro et al. 1998). Además se ha demostrado que embriones con un desarrollo más lento, posteriormente dieron lugar a hembras (Carvalho et al. 1996, Van Wagtendonk-de Leeuw et al. 1998, Gutierrez-Adan et al. 2001). Este fenómeno implicaría que en condiciones de cultivo *in vitro* los embriones macho soportan mejor el desarrollo al estadio de blastocisto que las hembras (Rosenfeld y Roberts 2004). No obstante, en otros estudios realizados en humanos, bovinos y murinos cultivados hasta el estadio de blastocisto, esta diferencia

de velocidad de desarrollo de los machos no ha sido tan evidente (Pomp et al. 1995, Kaminski et al. 1996, Holm et al. 1998) indicando que solo algunas condiciones de cultivo afectan de distinta forma a la velocidad de desarrollo de embriones macho o hembra.

En embriones bovinos, se ha observado que si se aumenta la concentración de glucosa en el medio de cultivo, desarrollan de forma más rápida los machos que las hembras (Bredbacka y Bredbacka 1996, Peippo 1999, Gutierrez-Adan et al. 2001, Larson et al. 2001). Larson observó un bloqueo en embriones bovinos en el momento de la formación de la cavidad del blastocelo, al añadir al medio de cultivo altas concentraciones de glucosa (Larson et al. 2001). Sin embargo, estudios similares, no han observado el fenómeno de disminución del desarrollo entre machos y hembras (Gutierrez-Adan et al. 1999).

### **Factor paterno**

La mayor parte de los estudios realizados en la alteración de la proporción del sexo, se basan en los factores que afectan a la madre, y poco se ha estudiado sobre factores que afectan al padre y que determinan el sexo de su descendencia. El macho, al ser el sexo heterogamético en mamíferos, presenta en su espermatozoide dos poblaciones potenciales de fecundación, su aporte teórico por cada evento de fecundación sería del 50%, asumiendo que en la espermatogénesis se produce la misma cantidad de espermatozoides con carga haploide "X" e "Y", y que en esa misma proporción llegan al sitio de fecundación. Sin embargo, el espermatozoide podría tener una motilidad diferente en el tracto reproductor de la hembra dependiendo de diferentes causas, como la viscosidad del moco uterino, la motilidad intrínseca del espermatozoide por buena condición mitocondrial y el pH vaginal. Asimismo, el tracto uterino tiene diversos nutrientes y secreciones que ayudarían o dificultarían al espermatozoide a llegar a penetrar el ovocito (Pratt et al. 1987, Martin 1997). El espermatozoide también puede mostrar muchas condiciones fisiológicas intrínsecas que contribuyen o no a fecundar, por ejemplo, su facilidad para realizar la capacitación espermática y posterior reacción acrosómica. Existen además otras condiciones que pueden posibilitar que un espermatozoide con determinada carga genética "X" o "Y" puedan potencialmente lograr la penetración de la zona pelúcida,

como el grado de maduración del ovocito y en el momento de la inseminación, lo que facilita el éxito de dicho evento (Dominko y First 1997).

También se ha observado que el estrés térmico modifica la proporción de sexos cuando se somete a altas temperaturas testiculares y luego se cruzan, la proporción del sexo disminuye (Perez-Crespo et al. 2008). Lo mismo sucede en ocupaciones donde existe un riesgo de mayores temperaturas testiculares como es el caso de los conductores, panaderos, o los expuestos a químicos, alcohol y radiación (Dickinson y Parker 1994, Thonneau et al. 1998, James 2008).

### **Edad parental**

El ambiente uterino, dependiendo de si éste se encuentra en situaciones óptimas para la gestación, maximiza los recursos energéticos para que la preñez se lleve con éxito, pudiendo hacer más viable el mantenimiento de embriones de un determinado sexo, en función de los requerimientos de ese sexo (Wells 2000). Padres de edades avanzadas pueden generar un estrés fisiológico que afecta al embrión o al feto, además de aumentar los problemas de pre-eclampsia, desórdenes cromosómicos y nacimientos prematuros que pueden llevar a la muerte prenatal (Rueness et al. 2012). En estos casos se ha observado que los machos son más sensibles a estos tipos de pérdidas (Vatten y Skjaerven 2004).

En la reproducción humana, parece existir una correlación entre la proporción del sexo con la edad paterna, y el orden de nacimiento de la descendencia. Novitski asoció una disminución del porcentaje de machos en padres con edades avanzadas con respecto a las madres de similar edad, y atribuyó esta diferencia debido al cambio de la frecuencia relativa de espermatozoides con carga “X” e “Y” (Novitski 1953, Ruder 1985), observado en los cambios del gen *HLA* que podría afectar los niveles de andrógenos en edades avanzadas (James 1996); así como también al aumento de la secreción de gonadotropinas maternas con la edad (James 1980).

También se ha descrito que la descendencia de los empleados de fábricas industriales de Finlandia entre los años 1775– 1850, fueron mayoritariamente niños, coincidiendo con periodos donde la población adulta de hombres fue joven (Lummaa 1998). Tras la revolución industrial hubo un exceso del nacimiento de mujeres en

ciudades industrializadas, lo cual aparentemente se correspondía con una elevada edad materna. En un estudio, en España entre los años 1945-1997 y otro realizado en Estados Unidos entre 1964-1988 con mujeres no caucásicas, se observó la misma correlación entre la disminución de la proporción de sexos y la edad materna (Gutierrez-Adan et al. 2000, Nicolich 2000). En madres del movimiento Laestadius de la religión Luterana, se ha observado que aquellas de edad avanzada, por encima de los 35 años, presentan varios partos (por encima de 10), en los que la mayoría son mujeres (Juntunen et al. 1997).

### **Otros tipos de factores**

Muchos son los estudios y muchos son los factores que parecen tener una relación con el desequilibrio de la proporción de los sexos. Sin embargo, existen otros factores que han sido menos relevantes en tratar de explicar de manera más global la causa de estas diferencias. Muchas de ellas esconden un factor más general que causa un efecto sobre ellas. Por ejemplo, se han reportado cambios hormonales producidos bajo condiciones de estrés en los hámsteres, donde la administración oral de cafeína distorsiona la proporción de sexos hacia la obtención de más hembras, y se sugiere que es debido a la inhibición de la actividad cAMP fosfodiesterasa que puede causar un estrés al embrión y modificar su viabilidad (Weathersbee et al. 1975). Asimismo, otros estudios han realizado diferentes tipos de estrés que reducen el tamaño de nacimientos de machos en roedores, como la administración subcutánea de ACTH (Hormona Adenocorticotrópica Humana) en ratas, el estrés por confinamiento en jaulas metálicas, y cruces a bajas temperaturas o simuladas con nor-epinefrina (Geiringer 1961, Lane 1973, Moriya y Hiroshige 1978, Krackow 1997).

En especies salvajes, se ha observado un aumento en la proporción de los sexos cuando se acercan las épocas de verano y primavera, posiblemente por la abundancia de alimento (Drickamer 1990). De forma similar en poblaciones humanas se reportó un efecto de la estacionalidad, donde se aprecia una disminución de la proporción de sexos entre los meses de Febrero-Abril y Mayo-Julio en poblaciones franco-canadienses (Nonaka et al. 1999). En otras poblaciones se observan efectos en función de la raza cuando se compararon las proporciones de sexo, siendo favorables a un mayor nacimiento de hombres, provenientes de parejas de población caucásica que de parejas

de procedencia afroamericana. (Khoury et al. 1984). Además se ha observado una mayor cantidad de nacimientos de machos en 6 especies de ungulados en cautividad (Cassinello 1996). También se han descrito modificaciones en la proporción de los sexos debidos al cambio de pH, instinto sexual, respuestas a tóxicos en las dietas, etc. (James 2004). Otras diferencias que dan lugar más nacimientos a hijos, son las enfermedades relacionadas al cáncer de próstata y a la hepatitis B relacionado con mayores concentraciones de andrógenos en el padre (James 1990), y de mayor nacimiento de niñas producidas por enfermedades como la esclerosis múltiple (Olsson y Brandt 1982), y el síndrome de no Hodgkin mostrando una relación del aumento y disminución de la testosterona con el estrés producido por la enfermedad (James 1994).

En India se ha propuesto que existe una relación entre la natalidad femenina y el nivel de educación, sugiriendo que sigue el modelo de una U invertida al momento de la concepción, dando mayor ventaja a los hijos al momento del nacimiento (Echavarrí y Ezcurra 2010). Como se ha descrito anteriormente, parece que el estrés desencadena un efecto sobre la proporción de los sexos. Situaciones como terremotos muestran la disminución en la proporción de machos (Fukuda et al. 1998) así como ataques terroristas (Catalano et al. 2005) o guerras (Macmahon y Pugh 1954). En fumadores se ha observado que la proporción secundaria del sexo se incrementa cuando las madres fuman más de 10 cigarros al día, en su primera gestación (Beratis et al. 2008), pero también se ha descrito el mayor nacimiento de niñas de padres y madres fumadoras (Fukuda et al. 2002, Parazzini et al. 2005).

Finalmente, uno de los factores que se ha estudiado poco y que generalmente no se considera al estudiar los mecanismos de control de la proporción del sexo, es la bilateralidad del tracto genital femenino. En la presente tesis, hemos considerado la lateralidad ovárica y uterina, analizando el número de ovocitos generados y fecundados, y la cantidad de implantaciones y reabsorciones en cada cuerno uterino. Además, la proporción del sexo puede ser distinta en función de la supervivencia de más poblaciones de espermatozoides con carga genética “X” o “Y” por cada evento de fecundación (en la ampolla del oviducto) o al anidamiento diferencial de los embriones machos y hembras en los cuernos uterinos derecho o izquierdo. También puede haber diferencias entre el momento de ovulación de cada ovario que pueda estar relacionado con la mayor disposición a ser fecundados por espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y”.

Existen pocos estudios en mamíferos sobre la asimetría reproductiva de los cuernos uterinos (Wimsatt 1975, Baird y Birney 1985). En la coneja, un exceso de hembras ha sido reportado en el útero derecho, mientras que en ratonas y en hembras de Gerbillos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) se muestra una distribución de los sexos en el útero derecho a favor de los machos (Endo et al. 1987, Clark et al. 1991). En otros estudios sin embargo no han encontrado esa diferencia (Peaker y Taylor 1996). En esta especie también se realizaron trasplantes de ovarios, cuando porciones del ovario derecho fueron trasplantados al lado izquierdo, se observó un mayor incremento de la proporción del sexo (Clark et al. 1994). De forma similar, en las ratas se ha visto una menor cantidad de sitios de implantación en el cuerno izquierdo (Buchanan 1974, Wiebold y Becker 1987). Una posible explicación a estos resultados es el caso del hámster, se encuentre una mayor concentración espermática en el cuerno derecho inmediatamente después de la monta (O y Chow 1987). En bovino, cuando se colectó embriones de los cuernos derecho e izquierdo de vacas superovuladas, se observó diferencias en el porcentaje de los sexos a favor de los machos en el cuerno derecho. Sin embargo no se dieron estas diferencias en los cuernos derecho e izquierdo cuando estas fueron ovariectomizadas unilateralmente, quizás por el poco número analizado o por la poca respuesta folicular luego de la ovariectomía (Hylan et al. 2009).

Aunque la sugerencia de la diferencia en la proporción de sexos por la lateralidad de origen no ha sido siempre bien aceptada (Cohen 1998), algunos autores han intentado explicar este mecanismo mediante la hipótesis de diferencias hormonales y de flujo sanguíneos entre derecha e izquierda (James 2001, Thomson et al. 2001, Avni et al. 2012). Debido a ello, en esta tesis consideramos que es un factor importante a valorar cuando se estudia la divergencia de la proporción de los sexos. Suponemos que las diferencias de riego sanguíneo que posee cada ovario y cuerno uterino, pueden generar una diferencia hormonal y ambiental, y participar en la determinación de las alteraciones de la proporción de sexos. Además, entender este mecanismo dual, puede ser un factor clave para comprender mejor el papel hormonal en el control global de los órganos encargados de la reproducción, y su influencia en el desarrollo del sexo que va a implantar, así como el ambiente nutricional para los diferentes tamaños de camada.

# Objetivos



## **OBJETIVO GENERAL:**

Analizar factores peri-implantacionales que pueden influir en la proporción de sexo en mamíferos, usando el ratón como modelo. Por una parte se consideran factores que puedan actuar diferencialmente en los espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y”, y en segundo lugar, analizar factores que influyen en la condición reproductiva materna, y que pudieran alterar la proporción primaria y secundaria de los sexos, considerando la lateralidad (origen ovárico y uterino derecho y/o izquierdo) como factor fundamental en los resultados.

## **Objetivos específicos:**

El objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

1.- Determinar si los espermatozoides transgénicos portadores de un marcador en el cromosoma “X” son similares a los no transgénicos y comprobar si los animales no presentan distorsión en sus poblaciones espermáticas “X” e “Y” ni en la proporción de sexo de su descendencia. Analizar si la proporción de sexos puede variar debido al método de selección espermática y/o de acuerdo a su origen (epididimal o vaso deferente); y si la inhibición de la motilidad uterina permite identificar *in vivo* diferencias de motilidad entre espermatozoides portadores del cromosoma “X” e “Y” que afecten a la proporción del sexo (capítulo I).

2.- Analizar la influencia del estrés nutricional y la diabetes inducida químicamente sobre la distorsión de sexos en etapas maternas pre- y post-concepcionales, considerando la lateralidad de cada oviducto y cuerno uterino (capítulo II).

3.- Analizar la influencia de las hemi-ovariectomías derecha o izquierda, y de la competencia embrionaria generada, en la proporción del sexo en cada cuerno uterino (capítulo III).

4.- Determinar si la velocidad de división del embrión a 3 células y posteriormente de las diferencias en velocidad de desarrollo a blastocisto pueden permitir seleccionar embriones de distinto sexo y distinta calidad embrionaria (capítulo IV).



# Capítulo I

**Influencia del factor paterno en la proporción primaria y secundaria de sexos: selección y maduración espermática, motilidad intrauterina y capacidad fecundante del espermatozoide portador del cromosoma “X” e “Y”**



## 1. Introducción

En mamíferos existe el consenso que la determinación del sexo de la progenie depende del sexo heterocromosómico, en este caso del macho, debido al aporte haploide de sus espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y”; siendo la probabilidad teórica de fecundación de los espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y” del 50%. En las teorías evolutivas es muy discutida la importancia del factor paterno en la determinación de la proporción de sexos, donde se asume que durante la espermatogénesis los gametos portadores del cromosoma “X” o “Y” permanecen unidos por conexiones tipo “gap junctions” hasta el estadio de espermátida donde cesa la transcripción, por lo que pueden intercambiar proteínas y transcriptos citoplasmáticos, y como consecuencia ambos tipos de espermatozoides se deberían de comportar exactamente igual. Sin embargo, el cromosoma “X” tiene un tamaño mucho mayor que el cromosoma Y, por lo que se espera que el tamaño y masa podría ser diferente en un espermatozoide portador del cromosoma “X” o “Y”. Estudios realizados sexando espermatozoides mediante citometría de flujo, mostraron una diferencia en motilidad, en particular en las velocidades rectilíneas y lineales medidos por sistemas CASA entre estas poblaciones de espermatozoides portadores de un cromosoma “X” o “Y” (Penfold et al. 1998).

Diversos estudios proponen que de acuerdo a la metodología empleada para la selección y capacitación espermática, se puede ejercer un desequilibrio de la proporción de sexos, lo que mostraría un distinto comportamiento en su motilidad/viabilidad o capacitación/reacción acrosómica, entre las poblaciones espermáticas “X” o “Y”. Por ejemplo, se propone que el hecho de nadar hacia la superficie en la capacitación espermática “*swim up*” selecciona una mayor cantidad de espermatozoides con carga genética “Y”, debido a que el espermatozoide con cromosoma “Y” es más ligero, rápido y pequeño que el “X” y por ello presenta una selección diferencial (McEvoy 1992, Johnson 2000). Es decir, dicha selección generaría una distorsión de la proporción del sexo hacia una mayor cantidad de machos (Pegoraro 2002). Así, en bovino, utilizando la técnica del “*swim up*”, se ha encontrado una mayor diferencia a favor de los machos con los espermatozoides obtenidos de la superficie, en contraste con la separación del esperma mediante el sistema de gradiente de densidades con Percoll u otras resinas, que

mostraron mayor obtención de hembras (Iwasaki et al. 1988). Este método de separación mediante gradiente de densidad es importante, puesto que el plasma seminal presenta glicoproteínas, polipéptidos y fibronectinas, que se unen firmemente a la superficie del espermatozoide, y al retirarlos ayuda a la capacitación espermática y posterior reacción acrosómica. Sin embargo, algunos estudios dan cuenta de que las poblaciones espermáticas separadas por gradientes de densidad o con la técnica del “*swim up*” no selecciona a los espermatozoides “X” e “Y” (Wolf 2008) y además niegan que el macho ejerza algún efecto en la proporción de sexos, cuando se realizan fecundaciones *in vitro* (Yan et al. 2006).

Por otro lado, si la viabilidad de los espermatozoides “X” e “Y” es distinta, la madurez y calidad del espermatozoide podría desencadenar un potencial diferencial para fecundar. En humanos se asocia la curva de proporción de sexo en forma de “U” obtenida en relación al momento de inseminación y ovulación, con la viabilidad y supervivencia de las poblaciones espermáticas “X” e “Y” (James 1996). Además, estudios realizados en humanos han sugerido que los espermatozoides provenientes del vaso deferente tras la descongelación presentarían mejor calidad a la hora de realizar una inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) que los utilizados en FIV e ICSI con espermatozoide fresco eyaculado (Hovatta et al. 1996). Además se observó que las tasas de fecundación y desarrollo a blastocisto fueron mayores cuando los espermatozoides provenían de la cola del epidídimo y del conducto deferente, y que estos valores disminuían cuando las muestras provenían de muestras eyaculadas (Pomerol et al. 1993, Miao, Liang et al. 2009).

Un factor importante que puede contribuir a la capacidad fecundante de los espermatozoides, es la interacción que tiene el espermatozoide con el útero, debido a que promueve las contracciones uterinas que facilitan su transporte hasta el lugar de fecundación, así como su influencia en la respuesta inmune para eliminar los excesos espermáticos muertos, dañados o inmóviles mediante fagocitosis. Un hecho que respalda esta interacción es haber detectado oxitocina y prostaglandinas en extractos de testículos y epidídimos, y en diferentes fracciones de fluido seminal de caballos y humanos respectivamente (Watson et al. 1999, Katila 2001). Sin embargo Katila concluye con la posibilidad de que la motilidad espermática no sea esencial para el transporte y más bien las contracciones uterinas tienen un rol determinante en el proceso

de fecundación (Katila 2001). La eliminación de estas contracciones uterinas nos permitiría analizar si *in vivo* existe una diferencia de motilidad de los espermatozoides portadores de los cromosomas “X” e “Y”.

En la presente tesis, debido a que utilizamos un modelo de ratón transgénico con un marcador de proteína verde fluorescente en el cromosoma “X” (*Green fluorescent protein*, X-EGFP) (Nakanishi et al. 2002, Kobayashi et al. 2006)(que utilizamos para determinar el sexo de los embriones y fetos) necesitamos comprobar en primer lugar si el espermatozoides transgénico se comporta de forma similar al no transgénico, y que la expresión del marcador no produce ningún efecto en el espermatozoide portador del transgén, ni altera la proporción de sexos. Nuestro objetivo es por una parte comprobar que los animales transgénicos con un marcador en el cromosoma “X” son óptimos para los estudios de proporción del sexo; y en segundo lugar, analizar si la proporción de sexos puede variar debido al método de selección espermática utilizado en procedimientos *in vitro*, y/o de acuerdo a su grado de maduración espermática, y/o por la inhibición de la motilidad intrauterina.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Animales**

Todos los experimentos de los capítulos I, II, III y IV, han sido llevados a cabo de acuerdo a la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea sobre Cuidado Animal (86/609/EEC) y siguiendo las guías del Uso de Animales de Laboratorio, adoptado y promulgado por la Sociedad de los Estudios sobre Reproducción (SSR), con el fin de minimizar el sufrimiento, el número de animales utilizados y el canibalismo en los momentos de restricción de alimento. Los animales provinieron de nuestra colonia del animalario del Departamento de Reproducción Animal del INIA de Madrid. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de ciclos de 14 horas de luz y 10 de oscuridad a 23°C y alimentación con dieta de cría (Global Diet 2018) y dieta de mantenimiento (Global Diet 2014) ambas de Harlan Laboratories (SantFeliu de Codines, Spain).

Se utilizaron hembras B6C3F1 (C57BL/6J “X” CBA) y CD1 y machos CD1 y transgénicos pCAGGS-EGFP (CX-EGFP, CX-38 Chr “X”), obtenidos del repositorio RIKEN BioResource Center, Japan, descrito previamente en (Nakanishi et al., 2002), portadores de una marca fluorescente en el cromosoma “X” (X-EGFP) de fondo genético B6C3F1. Este modelo murino transgénico se empleó para distinguir los blastocistos hembras de los machos (Anexo 1). Además, a un grupo de ratonas se les suministró *Ritodrine Hydrochloride* (250 mg/mL) (Sigma PubChem Substance ID 24278672).

Los embriones pre-implantacionales se recuperaron en medio tamponado M2 (Anexo 3) y se cultivaron en un medio optimizado con potasio suplementado con aminoácidos (KSOM, Specialty Media, Milipore, España) (Anexo 4) hasta su utilización.

## **2.2. Análisis del efecto del estado de maduración de los espermatozoides en la proporción primaria de sexos de embriones fecundados *in vitro***

### **2.2.1. Obtención de complejos cúmulos-ovocitos**

La estimulación ovárica se realizó mediante inyecciones intraperitoneales de 7,5 unidades internacionales (UI) de PMSG (gonadotropina sérica de yegua gestante, Folligon 500, Intervet), seguida a las 48 horas de una inyección con 7,5 UI de hCG (gonadotropina coriónica humana, Veterin Corion Equinvest). Después de 13-15 horas post hCG, las hembras se sacrificaron y los complejos cúmulos-ovocitos fueron recuperados mediante desgarro de la zona de la ampolla oviductal. Se colocaron en medio sintético de Fluido Tubárico Humano (*Human Tubal Fluid*, HTF; Anexo 5) a la espera de ser fecundados por los espermatozoides capacitados por *swim up*, procedentes de la cola del epidídimo o del conducto deferente de un ratón X-EGFP o de un macho control no portador del transgén, según el caso.

### 2.2.2. Obtención de espermatozoides y fecundación *in vitro*

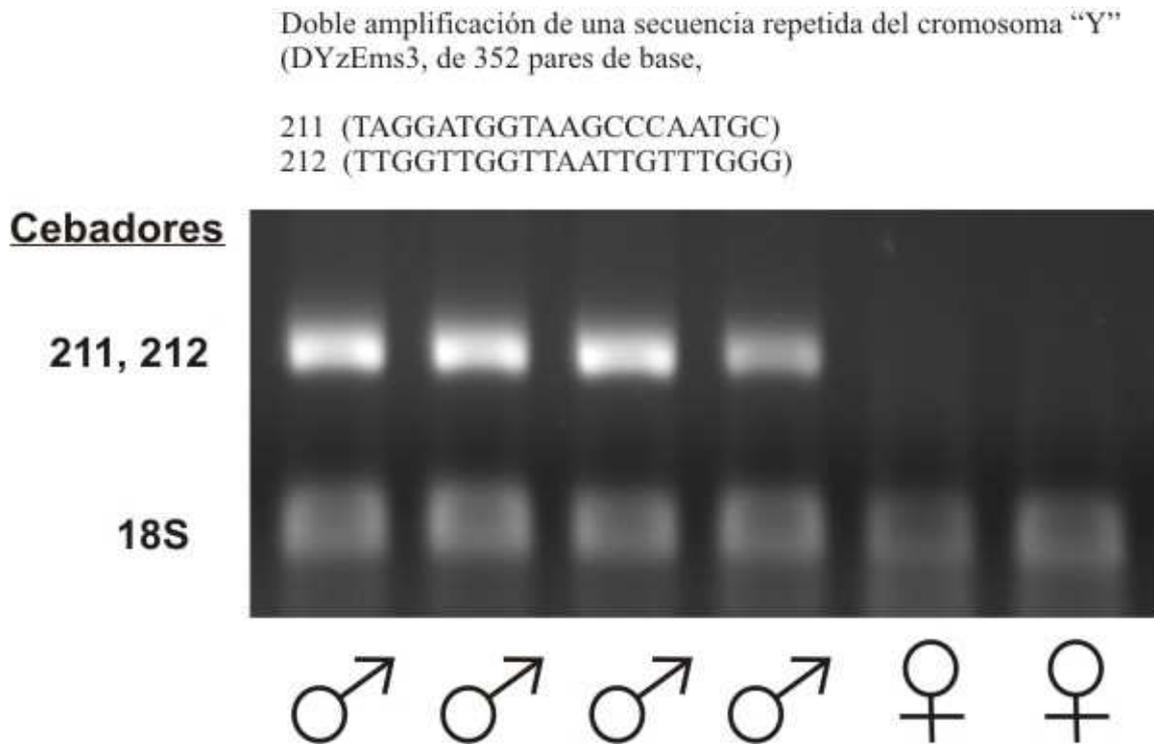
Se utilizaron machos adultos transgénicos X-EGFP y CD1; mediante identificación anatómica y cirugía se separaron las colas de los epidídimos y los conductos deferentes, conservando el contenido espermático en estos tejidos. Después de un suave arrastre mecánico, se liberaron los espermatozoides de ambos epidídimos y conductos deferentes en medio HTF equilibrado, incubándose para su capacitación *in vitro* durante 30 min, y ajustándose a una concentración de  $1 \times 10^6$  espermatozoides por mL para la inseminación de los complejos cumulus-ovocitos maduros.

Después de 4-6 horas post-inseminación, se recuperaron los presuntos cigotos, mediante lavados sucesivos en medio HTF equilibrado eliminando el exceso de espermatozoides no adheridos, posteriormente se cultivaron en medio KSOM, y se mantuvo en incubación a 37°C en atmósfera húmeda de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) hasta 84 horas post hCG, es decir el día que corresponde al estadio de blastocisto.

### 2.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase chain reaction, PCR*) para determinar el sexo de los embriones

Para la determinación primaria del sexo de los blastocistos provenientes de machos CD1 (no portadores del transgén), primero se digirieron con proteinasa K (100 mg/mL) durante toda la noche a 55°C. A continuación, se procedió a determinar el sexo de los embriones mediante PCR. Se realizó una doble amplificación de una secuencia repetida del cromosoma “Y” (DYzEms3, 352 pares de base, Anexo 6) (Navin et al. 1996), usando el gen autosómico Rn18S como control de ADN genómico (Anexo 6). La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL de la mezcla de PCR conteniendo 1U de Taq polimerasa (Promega, Madrid España), 5 µL de tampón 5X (Promega), 100 µM de dNTP, 0,1 µM de cada cebador sentido y antisentido (DYzEms3y Rn18S) y 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>. A continuación, las muestras se colocaron en el termociclador, el primer ciclo se realizó con 3 minutos para su desnaturalización a 95°C, 45 segundos a 55°C para la hibridación y 45 segundos a 72°C para la extensión y luego 34 ciclos de 15 segundos para su desnaturalización a 95°C; 45 segundos de temperatura de hibridación a 55°C y 20 segundos de extensión a 72°C. A continuación, se utilizaron 15 µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 2,0% para proceder a

una electroforesis a 200 voltios durante 20 min. Se realizó la tinción con *SafeView*<sup>TM</sup> (Safe View Nucleic Acid Stain, New Live Biochem; 5 µL en el gel de agarosa) y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta. Dos bandas en el revelado significaban que la muestra era de un blastocisto macho, mientras que una sola banda (18S) significaba que la muestra provenía de un embrión hembra (Figura 1).



**Figura 1: Reacción en cadena de la polimerasa de blastocistos de ratón no transgénico para la identificación del sexo. 2 bandas (macho), 1 banda (hembra)**

---

#### **2.2.4. Determinación de la proporción primaria del sexo obtenidos de fecundación y desarrollo pre-implantacional *in vivo***

Se indujo la superovulación a ratonas B6C3F1 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.1 y se cruzaron con machos X-EGFP mediante fecundaciones *in vivo*, posteriormente se recuperaron los embriones en día 3,5 mediante lavados oviductales y uterinos, registrando la proporción de sexos, la cantidad de embriones recuperados y el número de células del trofotodermo (TE) y la masa celular interna (MCI) de blastocistos machos y hembras.

#### **2.2.5. Doble tinción para el recuento del número de células de los blastocistos**

Para la tinción diferencial, se permeabilizó el blastocisto en una solución de Yoduro de propidio 10 mg/mL disuelto en tritón X-100 al 0,2% durante 30 segundos en una placa térmica a 37°C. Posteriormente, se mantuvo en solución de tinción y fijación de 25 µg/mL de bisbenzimidida (Hoechst 33342, Sigma B2261) disuelta en alcohol etílico absoluto durante 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se colocaron los blastocistos en glicerol en una lámina portaobjetos para visualizarlos al microscopio de epifluorescencia. Se hicieron múltiples fotografías a diferentes secciones, así como un análisis de imágenes para el recuento celular utilizando el programa ImageJ.

#### **2.3. Determinación de la proporción secundaria de sexos obtenidos con fecundaciones *in vivo***

Para los estudios relativos a la divergencia de la proporción secundaria de los sexos obtenidos para nuestro modelo transgénico, se procedió a cruzar a estos machos mediante monta natural (sin superovulación de las hembras) con ratonas de la cepa CD1 y B6C3F1 (Anexo 2). Después de registrarse el día del tapón vaginal, los embriones se dejaron desarrollar *in vivo* hasta el momento de recoger los datos de proporción de sexos y el número de implantaciones y reabsorciones (día 12 desde la observación del tapón vaginal). Estos datos fueron tomados de los experimentos control de los capítulos II, III y IV.

#### **2.4. Motilidad espermática y capacidad fecundante intrínseca de espermatozoides “X” e “Y”**

Los embriones en estadio de cigoto fueron recuperados de la ampolla de cada oviducto a las 27 horas después de la inyección de 7 UI de hCG y cruce con el macho, realizando lavados con medio tamponado M2, siempre tomando en cuenta la lateralidad de procedencia. Posteriormente se cultivaron *in vitro* en medio KSOM separando aproximadamente el 20-30% de los embriones de división más rápida, (grupo rápidos “R”), quedando el resto como el grupo lentos “L”. De forma similar se recuperaron y separaron en el mismo porcentaje que el grupo anterior, los cigotos provenientes de hembras B6C3F1 superovuladas a las cuales inyectó 250 mg/mL de *ritodrine hydrochloride* la noche anterior a la determinación del tapón vaginal y se cruzaron con machos X-EGFP de fondo genético B6C3F1, los cigotos recuperados se cultivaron en medio KSOM hasta el estadio de blastocisto para la determinación primaria del sexo (Anexo 1).

#### **2.5. Análisis estadístico**

En las comparaciones estadísticas se utilizó el programa SigmaStat 3.5 (SystatSoftware, Inc). Todos los análisis de proporción de sexo, tanto primario como secundario, se realizaron a través de una prueba de Chi-cuadrado con bondad de ajuste. Para comparación del recuento celular entre machos y hembras se utilizó un análisis mediante una *t-student*. En los casos donde el valor de confianza fue superior al 95% se consideró como diferencia significativa.

### 3. Resultados

#### 3.1. Determinación de la proporción del sexo de embriones producidos *in vivo* de machos transgénicos X-EGFP

Los datos de las Tabla 1 muestran un patrón similar a los resultados teóricos esperados de 50% en la proporción de machos y hembras, no existiendo diferencias cuando se fecundaron mediante monta natural hembras superovuladas B6C3F1 con machos transgénico X-EGFP o controles no transgénico, indicando que la presencia del transgén no afecta la proporción de sexos. Asimismo la Tabla 1 muestra que no existió diferencias en la cantidad de embriones recuperados. En la Tabla 2 se observa que el número de células del trofotodermo y de la masa celular interna es similar para los blastocistos de distinto sexo producidos *in vivo* en los animales transgénicos.

**Tabla 1. Proporción primaria de sexos y número de embriones recuperados, mediante estimulación ovárica con monta natural**

	N° embriones totales			Proporción de sexos		N° de embriones recuperados por ratona(media±SEM)
	Total	Macho	Hembra	Macho (%)	Hembra (%)	
<b>X-EGFP</b>	1170	598	572	51,11	48,89	27,39±1,9
<b>Control</b>	352	179	173	50,85	49,15	26,3±2,4

**Tabla 2. Recuento celular de la masa celular interna y del trofotodermo de blastocistos producidos *in vivo***

	n	N° de células totales (media±SEM)		N° células trofotodermo (media±SEM)		N° células MCI (media±SEM)	
		Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
X-EGFP	45	51,86 ±2,96	46,39 ±1,96	37,18 ±2,35	33,22 ±1,46	14,68 ±0,88	13,17 ±0,75

### 3.2. Determinación de la proporción secundaria de sexos

Los resultados de la Tabla 3 muestran la ausencia de una distorsión en las proporciones secundarias del sexo a nivel global tanto en las cepas CD1 (394 fetos, 48% de machos) como en la B6C3F1 (339 fetos, 51% de machos), con respecto al teórico de machos y hembras (50:50). Asimismo el tamaño de camada se presenta dentro de los parámetros normales de cada cepa (11-13 en cepas CD1 y 7-9 en cepas con fondo genético C57BL6/J), con escasa muerte fetal por reabsorción (datos no mostrados).

**Tabla 3. Proporción secundaria de sexos utilizando el macho X-EGFP y hembras CD1 y B6C3F1**

	N° fetos			Proporción de sexos		Tamaño total de camada(N° de fetos±SEM)	
	Hembras	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Total
<b>CD1</b>		394	191	203	48,0	52,0	13,13±0,65
<b>B6C3F1</b>		339	173	166	51,0	49,0	8,92±0,53

### 3.3. Efecto de la maduración espermática en la proporción del sexo de embriones producidos por fecundación *in vitro*

Al realizar fecundaciones *in vitro* con muestras espermáticas control (CD1, no consanguíneo) y transgénicas (X-EGFP, F1 de dos cepas consanguíneas) provenientes de cola de epidídimo o de conducto deferente, no se encontraron diferencias en el porcentaje de sexos de los blastocistos provenientes de las muestras espermáticas de cola de epidídimo (Tabla 4). Sin embargo, en blastocistos de la cepa no consanguínea hay una diferencia a favor del desarrollo de embriones hembra en muestras espermáticas obtenidas de conducto deferente y utilizadas para fecundación *in vitro* ( $p < 0,01$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4. Porcentaje de sexos de blastocistos obtenidos mediante fecundación *in vitro* (FIV) con espermatozoides de cola de epidídimo y de conducto deferente**

Fuente Spz en la FIV	Blastocistos totales, n			Porcentaje de sexos	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
<b>Epidídimo CD1</b>	192	100	92	52,08	47,92
<b>Deferente CD1</b>	212	89	123	41,98 <sup>a</sup>	58,02 <sup>b</sup>
<b>EpidídimoB6C3F1</b>	1052	527	525	50,10	49,90
<b>DeferenteB6C3F1</b>	642	340	302	52,95	47,05

N=número de embriones. <sup>a,b</sup> indica diferencias significativas con  $P<0,01$ .

### 3.4. Efecto de la relajación muscular uterina sobre la fecundación espermática en la primera división embrionaria

Para determinar si la motilidad de los espermatozoides portadores del cromosomas “X” o “Y” es distinta y puede tener un efecto en la proporción de sexos, se inhibió la contractibilidad del tracto genital femenino y se evaluó el sexo de los embriones obtenidos en cada oviducto, seleccionando los embriones por la velocidad de la primera división mitótica del cigoto. Las hembras fueron inyectadas con *Ritodrine hydrochloride* (un inhibidor de las contracciones del músculo liso del útero) al momento de la inyección de hCG a una concentración de 250 mg/mL (Guidobaldi et al. 2012). La inhibición de la motilidad produce que los espermatozoides tengan que llegar al lugar de fecundación exclusivamente gracias a su motilidad. Con este modelo se puede analizar si existe alguna diferencia en motilidad *in vivo* entre espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y”. Los resultados de la Tabla 5, muestran diferencias en la proporción de sexos de los grupos de rápidos tanto en el lado derecho como el izquierdo de los controles. Estas diferencias no se observan en los animales tratados con ritrodine. Además, se observa que el número de ovulaciones fue mayor en el ovario derecho, reflejado en la mayor cantidad de embriones encontrados en el lado derecho; adicionalmente se observó que del ovario derecho eran los primeros en ovular y realizar la primera división celular (datos no mostrados).

**Tabla 5. Proporción de sexos en embriones agrupados por la velocidad de la primera división embrionaria, provenientes del ovario derecho e izquierdo de hembras tratadas con *Ritodrine hydrochloride***

	IZQUIERDO n, (%)			DERECHO n, (%)			TOTAL n, (%)		
	Rápido	Lento	Subtotal	Rápido	Lento	Subtotal	Rápido	Lento	Total
<b>Control machos</b>	56 (63,64) <sup>c</sup>	151 (49,02)	207 (52,27)	45 (61,64) <sup>a</sup>	242 (51,27)	287 (52,66)	101 (62,63) <sup>c</sup>	393 (50,38)	494 (52,50)
<b>Control hembras</b>	32 (36,36) <sup>d</sup>	157 (50,98)	189 (47,73)	28 (38,36) <sup>b</sup>	230 (48,73)	258 (47,34)	60 (37,27) <sup>d</sup>	387 (49,62)	447 (47,50)
<b>Ritodrine Machos</b>	47 (44,76)	145 (49,66)	192 (48,36)	51 (56,67)	180 (53,57)	231 (54,23)	98 (50,26)	325 (51,75)	423 (51,40)
<b>Ritodrine Hembras</b>	58 (55,24)	147 (50,34)	205 (51,64)	39 (43,33)	156 (46,43)	195 (45,77)	97 (49,74)	303 (48,25)	400 (48,60)

n=Número de cigotos llegados a blastocistos en cultivo *in vitro*, (%)=porcentaje.

Diferencias entre machos y hembras: <sup>a,b</sup> indican, significativas con  $p<0,05$ ; <sup>c,d</sup> indican, significativas con  $p<0,01$

#### 4. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que los ratones transgénicos portadores de un marcador fluorescente en el cromosoma “X” no alteran la proporción del sexo de sus descendientes, indicando que ambos espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y” tienen en condiciones normales, igual capacidad de fecundar y demostrando la inocuidad de la presencia del transgén en el cromosoma “X”. El desarrollo pre-implantacional *in vivo* e *in vitro* de los embriones transgénicos es similar al de los embriones no transgénicos del mismo *background* y el número de células de la MCI y del TE son similares entre machos y hembras. Los valores son similares a los observados anteriormente de ratones híbridos no transgénicos (Burgoyne 1993) y utilizando diferentes técnicas de marcación celular (Handyside y Hunter 1984), indicando que al menos los embriones producidos *in vivo* no muestran diferencias ligadas al sexo en el número de células, y que la presencia del transgén tampoco afecta el número de células del embrión.

En las fecundaciones *in vivo* con superovulación de las hembras, no se observa una diferencia a favor de ningún sexo. Tampoco difieren los tamaños de camada, y las escasas reabsorciones y pérdidas embrionarias, no parecen afectar el equilibrio de sexos en los embriones y fetos producidos con el esperma transgénico X-EGFP. Además contribuye el haber realizado el cultivo *in vitro* con un medio optimizado como es el KSOM para que las diferencias entre embriones de distinto sexo no sean tan marcadas, debido a que el KSOM mantiene mejor las características morfológicas, genéticas y epigenéticas, y a pesar que retrase ligeramente el desarrollo que las condiciones *in vivo*, sus características para dar embriones capaces de transferirse e implantar son buenas (Erbach et al. 1994, Summers 2013).

En el experimento de FIV donde comparamos espermatozoides de cola del epidídimo y del vaso deferente, no se observan diferencias en la proporción de sexos en la cepa B6C3F1 transgénica. Sin embargo, llama la atención la alta producción de hembras cuando las muestras espermáticas provienen de conducto deferente en la cepa CD1. Los espermatozoides del vaso deferente son los primeros eyaculados y sirven en el caso del ratón para cambiar el pH vaginal, momento en el que generalmente mueren, siendo posteriormente los espermatozoides de la cola del epidídimo los que llegan al útero. Es posible que *in vitro*, estas poblaciones del vaso deferente se comporten de

forma diferente debido a su mayor periodo de maduración en el epidídimo y vaso deferente, y como consecuencia las diferencias entre poblaciones espermáticas “X” e “Y” se hagan más evidentes en estos espermatozoides con mayor grado de maduración. Desconocemos cual es el motivo que solo el efecto se vea en CD1 y no en B6C3F1, suponemos que es un efecto del *background* genético.

El transporte y la fecundación de los espermatozoides en el óvulo están también supeditados a las contracciones uterinas y de flujo oviductal (Guidobaldi et al. 2012). Si bien los espermatozoides intrínsecamente tienen una motilidad lineal y progresiva, éstos están ayudados por las condiciones maternas que permiten llegar en pocas horas al istmo del oviducto, lugar donde se va a llevar a cabo la fecundación (Suarez y Pacey 2006). En las cavernas del oviducto se encontrarán las primeras oleadas de espermatozoides que han sobrevivido a las condiciones uterinas previas, gracias al fluido seminal que inmunosuprime en cierta manera al ambiente uterino (Katila 2001), aguardando hasta recibir la señal de fecundación que culminará en la capacitación espermática para la posterior reacción acrosómica y penetración (Guidobaldi et al. 2012). Se ha demostrado que los espermatozoides portadores de cromosoma “X” e “Y” difieren en algunos parámetros de su motilidad lineal y progresiva (Penfold et al. 1998). Nosotros hemos comprobado que *in vivo*, cuando se inhibe las contracciones del útero a hembras superovuladas, no se modifica el porcentaje de machos y hembras. Sin embargo *in vivo*, cuando no se inhiben las contracciones, los primeros embriones que se dividen tanto del oviducto derecho como del izquierdo son machos, indicando que los espermatozoides “Y” son más rápidos que los portadores del cromosoma “X” para fecundar el ovocito, pero no debido a su motilidad lineal (que debería haberse puesto en evidencia cuando se inhibían las contracciones del tracto femenino). Los resultados indican que las contracciones uterinas son críticas para que los espermatozoides portadores del cromosoma “Y” fecunden antes que los espermatozoides “X”, y que las diferencias en estas poblaciones deben producirse en características relacionadas no con la motilidad lineal sino con la capacitación, hiperactivación y/o la reacción acrosómica.

En resumen, nuestro estudio muestra, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la utilización de espermatozoides provenientes un ratón transgénico X-EGFP no altera la proporción del sexo primario y secundario. Por ello, es un modelo adecuado para los estudios realizados en los siguientes capítulos de la presente tesis, donde las diferencias

existentes de acuerdo a los experimentos diseñados están referidas únicamente al factor materno. Hemos demostrado también que existen diferencias entre los espermatozoides del vaso deferente y del epidídimo que pueden afectar la proporción de sexo. Además hemos observado que en condiciones de inhibición de las contracciones uterinas la proporción de sexos de los embriones es la misma, y en el caso de los controles (sin inhibición), las contracciones uterinas facilitan inicialmente la fecundación de los espermatozoides portadores del cromosoma Y, sugiriendo la existencia inicial de diferencias en capacitación, reacción acrosómica, hyperactivación y/o capacidad para penetrar el ovocito.

# Capítulo II

**Efecto de la restricción de alimento durante el periodo peri-concepcional y la diabetes químicamente inducida en la proporción de sexos y tamaño de camada considerando la bilateralidad**



## INTRODUCCIÓN

Las diferentes teorías evolutivas sobre el efecto de la condición materna en la determinación del sexo han sido valoradas en varias especies animales obteniendo resultados diversos (Armitage 1987, Avery 1989, Pratt y Lisk 1989, Perret 1990, Bacon y McClintock 1999, Edwards y McMillen 2001). Así, un meta-análisis de casi 1000 trabajos, mostró la existencia de resultados con correlación positiva, negativa e incluso la no existencia de correlación (Cameron 2004) con la teoría de condición corporal materna de Trivers y Willard (Trivers y Willard 1973). De estos múltiples estudios se ha derivado la hipótesis de que al menos 3 factores parecen provocar una distorsión hacia un sexo determinado, como son la condición corporal materna (Bronson y Marsteller 1985, Andersson y Bergstrom 1998, Rosenfeld et al. 2003, Rosenfeld y Roberts 2004, Alexenko et al. 2007, Cameron y Linklater 2007), la concentración de glucosa (Pratt y Lisk 1989, Perret 1990, Pratt y Lisk 1990, Rjasanowski et al. 1998, Hahn 1999, Machado et al. 2001) y la relación entre el momento de ovulación y de fecundación (Kojola 1989, Cameron y Linklater 2007).

En poblaciones africanas inmersas bajo pobres condiciones de desarrollo, se ha visto afectada la proporción positiva del sexo (proporción de machos) debido a la condición materna durante la gestación, registrándose un mayor nacimiento de mujeres en condiciones maternas de malnutrición (Andersson y Bergstrom 1998). Diversos trabajos en ratones donde se experimentaban diferentes dietas, alterando la cantidad de los componentes nutricionales, como grasa o carbohidratos, mostraron resultados dispares en la proporción del sexo. Por ejemplo, en las dietas con mayor contenido de grasa se evidenció un sesgo de la proporción de sexos hacia una mayor cantidad de machos y cuando se estudiaron las proporciones del sexo utilizando dietas con mayor contenido de carbohidratos, aumentaba la población de hembras (Rosenfeld et al. 2003, Rosenfeld y Roberts 2004). En ocasiones, un tipo de componente específico del alimento puede ser el causante de la distorsión del balance de los sexos. Por ejemplo, cuando se alimentó a ratonas con suplementos ricos en ácidos grasos poli-insaturados, en concreto con mayor contenido en Omega 3, la descendencia tuvo una mayor proporción de machos, y cuando los ácidos grasos contenían más Omega 6, se obtuvo una mayor cantidad de hembras (Fountain et al. 2008). Otros resultados muestran como la distinta concentración de sodio administrado en el estadio pre-ovulatorio afecta de forma inversa la proporción secundaria del sexo, o lo que es lo

mismo, a mayor concentración de sodio se obtenía una menor proporción de machos (Bird y Contreras 1986).

Por otro lado, se sabe que en una dieta normal, el aporte de macro y micronutrientes son importantes para el mantenimiento de los niveles de glucosa del embrión y de los futuros estados gestacionales (McMillen y Robinson 2005). De lo contrario se pueden producir anomalías congénitas en el feto, como problemas cardiovasculares, diabetes y otros desórdenes metabólicos, condicionando la supervivencia al nacer o alterando los fenotipos de fetos en comparación con aquellos provenientes de madres alimentadas con dietas equilibradas (Simonetta et al. 1991, Edwards y McMillen 2001, Fernandez-Twinn et al. 2003).

En dietas con bajo contenido proteico, se obtuvieron bajos pesos al nacer, así como hiperinsulinemia, diabetes y problemas relacionados con el síndrome de resistencia a la insulina (Fernandez-Twinn et al. 2003). Esta última se ha observado en países recientemente industrializados. Su importancia reside en que la insulina regula el metabolismo del azúcar, proteínas y grasa, manifestándose este síndrome cuando los receptores de los tejidos no llegan a captar la insulina, y esta se va acumulando en el torrente sanguíneo. Posteriormente, los altos contenidos de azúcar desencadenan diabetes acompañados de altas presiones sanguíneas y altos niveles de triglicéridos (Mi et al. 2000). Es por ello, por lo que el descontrolado contenido de proteínas, carbohidratos y azúcares en la dieta, pueden generar desórdenes que afectan a los sistemas involucrados en la reproducción.

En mujeres diabéticas, los altos contenidos de glucosa en sangre tienen efectos nocivos para el embrión y el feto, que conllevan procesos apoptóticos, o desencadenan malformaciones fetales y alteraciones de la proporción de sexos (Ehrlich et al. 2012). En estos últimos años se ha reducido la tasa de muerte perinatal por hiperglucemia, gracias a los tratamientos con insulina. Sin embargo, aún se mantienen latentes los cambios que ocurren a nivel epigenético en los blastocistos producidos bajo estas condiciones, como el incremento de la expresión del gen Bax y el incremento de apoptosis en presencia de altas concentraciones de glucosa (Moley et al. 1998). Ciertos estudios *in vitro* donde se suplementa el medio de cultivo con un mayor contenido de glucosa han mostrado diferencias en la distorsión del sexo hacia la obtención de mayor cantidad de machos en embriones bovinos (Gutierrez-Adan et al. 2001), encontrándose correlación entre el tiempo de inseminación y la concentración de glucosa y de hormona luteinizante durante el estro (Rorie 1999, Cameron 2004). Sin embargo en otros trabajos, en el

---

modelo *in vivo* de ratón no se observaron cambios en la proporción de sexos y sólo se encontraron diferencias en el peso al nacer en neonatos provenientes de transferencias realizadas a receptoras sanas (Bermejo-Alvarez et al. 2012). Además, se ha observado una diferencia a favor del desarrollo y la supervivencia de los machos cuando se suplementa con glucosa el medio de cultivo *in vitro* (Gutierrez-Adan et al. 2001).

Debido a que las distintas dietas determinan la condición corporal materna y regulan la homeostasis fisiológica donde se desarrolla el embrión, también podrían afectar a la supervivencia de embriones en función de su género. Dietas con un alto contenido calórico y bajas en proteínas pueden generar cuadros de hiperglucemia y condicionar el estatus saludable del embrión o feto, ya que pueden ocurrir episodios apoptóticos parciales o generalizados (Armitage 1987, Kwong 2000, Fernandez-Twinn et al. 2003). Además, las dietas con alto contenido en grasas son capaces de modificar los parámetros hormonales debido a que se valen de ellas para su síntesis (Brewer y Balen 2010), afectando posiblemente el momento de ovulación, al cual se le ha atribuido un rol en la distorsión del sexo (James 1996). Posiblemente, la razón resida en que, dependiendo del momento de la fecundación, el ovocito y el espermatozoide podrían encontrarse en una madurez asincrónica producto de la fluctuación del pico de gonadotropinas (Avery 1989). Todo ello, unido a otras posibles modificaciones fisiológicas como el pH vaginal (Pratt et al. 1987), puede condicionar a las poblaciones espermáticas, modificando su motilidad y longevidad. Adicionalmente, el tiempo de ovulación y fecundación tendrían una influencia sobre las secreciones oviductales y uterinas (Wang et al. 2005, Whyte et al. 2007). Estas actúan como tampones y son de gran importancia en la supervivencia del embrión, pudiendo condicionar las diferencias en la proporción de los sexos (Gardner et al. 2005).

Nuestro objetivo es determinar por una parte el efecto de la restricción de alimento y por otra parte el efecto de la hiperglucemia (diabetes inducida químicamente) en etapas claves de la peri-concepción sobre la determinación primaria y secundaria del sexo, tamaño de camada y calidad embrionaria/fetal.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Animales

Los animales fueron mantenidos con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, a una temperatura de 23°C y humedad relativa de 60%. Las hembras utilizadas fueron destetadas en el día 21 o 22 de nacimiento y al llegar a una edad entre 6-15 semanas se cruzaron con machos fértiles individualizados. La determinación de la cópula se realizó observando la presencia del tapón vaginal en las ratonas primíparas 12 horas después del cruce (día 0,5 del embrión pre-implantacional).

Se utilizaron hembras pertenecientes a dos cepas: B6C3F1 (C57BL/6J x CBA) y Random Swiss-Webster (CD1 no consanguínea) para los experimentos relativos a restricción de alimento, superovulación y diabetes. Además se utilizaron hembras adultas CD1 como pseudogestantes. También se emplearon machos fértiles y vasectomizados de la cepa CD1 para los cruces, y ratones machos B6C3F1 con el transgén X-EGFP (CX-EGFP, CX-38 Chr X D), descrito previamente por Nakanishi (Nakanishi, Kuroiwa et al. 2002), para la determinación del sexo en los blastocistos y fetos obtenidos (Anexo 1 y 2 respectivamente).

### 2.2. Protocolo de estimulación ovárica y obtención de embriones pre-implantacionales

Para la superovulación se utilizaron hembras adultas de 6-15 semanas las cuales fueron inyectadas de forma intraperitoneal con 7,5 unidades internacionales (UI) de gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG Folligon 500, Intervet) seguida 48 horas después de una segunda inyección intraperitoneal con 7,5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Veterin Corion Equinvest), para posteriormente cruzarlas con machos fértiles X-EGFP.

Tras comprobar la existencia de tapón vaginal, los embriones se recuperaron del oviducto mediante lavados por el infundíbulo utilizando el medio tamponado M2 (distinguiendo el lado derecho e izquierdo del ovario/oviducto de origen) y posteriormente se cultivaron *in vitro* en un medio optimizado con potasio suplementado con aminoácidos (KSOM Specialty Media, Milipore, España) y con 5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma A6003), hasta el estadio de

desarrollo deseado. La formulación de los medios de mantenimiento y de cultivo se encuentra detallada en los Anexos 3 y 4.

### 2.3. Diseño experimental de los grupos bajo estrés alimenticio

Todas las ratonas fueron alimentadas con dieta comercial equilibrada estándar para roedores (2014 Teklad Global, Harlan Ibérica) y agua *ad libitum*; el grupo con sometimiento a estrés por restricción de alimento programado, se les retiró el alimento de acuerdo al diseño experimental propuesto para las etapas de pre-ovulación y pre-implantación.

Para el estudio de la proporción secundaria de los sexos por influencia del estrés nutricional pre-concepcional, se hicieron 3 grupos: uno en el cual el alimento era suministrado 24 horas (F) y luego se restringía otras 24 horas (R) de manera alternativa durante 8 días (grupo 8RF), es decir, se le retiraba y suministraba alimento de forma intermitente por cada día y durante 8 días previos al cruce con el macho, y solo recuperaba el estado *ad libitum* el día que se observaba la presencia del tapón vaginal. En el segundo grupo pre-concepcional, el alimento era restringido a la mitad de la cantidad ingerida por día y por ratona (1,0 gramo de alimento para la cepa B6C3F1) durante una semana previa al cruce con el macho (grupo 7R/2), recuperando su estado de *ad libitum*, igual que el caso anterior, cuando se observaba la presencia de tapón vaginal. En el tercer grupo se utilizaron ratonas CD1 sometidas a superovulación, produciéndose dicha restricción de 48 horas entre las inyecciones de PMSG/eCG y la hCG (grupo eRh), recuperando luego el estado *ad libitum*.

También se analizó la distorsión del sexo en ratonas cuyo alimento fue restringido en periodos embrionarios pre-implantacionales retirándose el tercer y cuarto día desde la presencia del tapón vaginal (grupo R<sub>3-4</sub>).

En todos los experimentos llevados a cabo se registró el sexo, la posición, el tamaño de camada y la pérdida de fetos por reabsorciones en los grupos de restricción de alimento, transferencias y controles en cada uno de los cuernos uterinos para la determinación del sexo primario y secundario. El esquema del diseño experimental se realizó como indica la Figura 1.

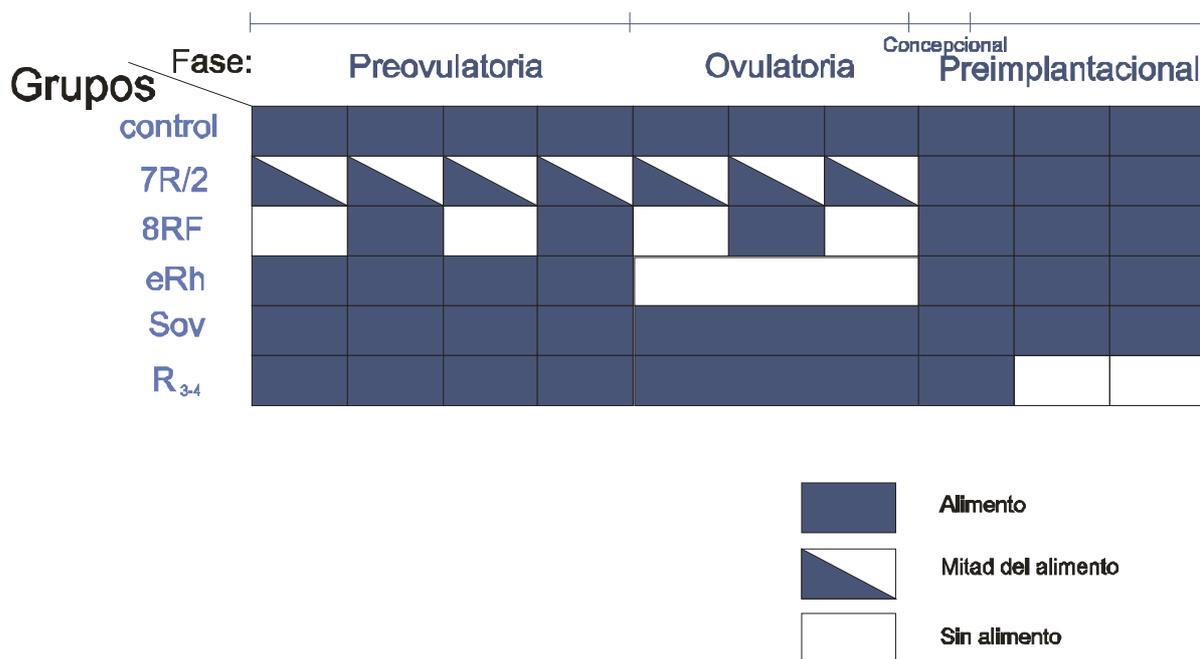


Figura 1: Diseño experimental de dietas y alimento restringido en estadios de peri-concepción

### 2.4. Inducción de diabetes

Para el desarrollo de este experimento se utilizaron 17 ratonas CD1 de 6-15 semanas de edad las cuales fueron sometidas a cruces con machos X-EGFP y retiradas del cruce una vez detectada la presencia del tapón vaginal. Al cabo de 48 horas, se aplicó una inyección única intraperitoneal de aloxano (*Alloxan Monohydrate*, “ALX” Sigma-Aldrich A7413) a la dosis de 200mg/Kg, dejando previamente a la ratona en ayuno durante 15 horas. El aloxano destruye selectivamente los islotes β del páncreas que producen insulina, generando *diabetes mellitus* de tipo 1.

El día 3,5 de gestación, se determinó el nivel de glucosa en sangre mediante un pequeño corte en el extremo de la cola y colocando una gota de sangre en la tira reactiva del glucómetro (Glucocard G sensor, Arkray Factory, Inc.). Las muestras que daban registros superiores a 400 mg/dL de glucosa en sangre fueron consideradas como ratonas diabéticas (hiperglucémicas) (Diamond et al. 1989). Para los controles se utilizaron ratonas no inyectadas, con valores normales por debajo de 200 mg/dL. A continuación se lavaron los oviductos y úteros de estos

animales con medio tamponado recuperándose los blastocistos, evaluándose la proporción de sexo total y parcial producido por cada ovario derecho e izquierdo.

### **2.5. Doble tinción para recuento del número de células de la masa celular interna y del trofotodermo de los blastocistos**

Para la tinción diferencial, se permeabilizó el blastocisto en una solución de Yoduro de propidio 10 mg/mL disuelto en tritón X-100 al 0,2% durante 30 seg en una placa térmica a 37°C. Posteriormente, se mantuvo en solución de tinción y fijación de 25 µg/mL de bisbenzimidida (Hoechst 33342, Sigma B2261) disuelta en alcohol etílico absoluto durante 3 min a temperatura ambiente. Finalmente, se colocaron los blastocistos en glicerol en una lámina portaobjetos para visualizarlos al microscopio de epifluorescencia. Se hicieron múltiples fotografías a diferentes secciones, así como un análisis de imágenes para el recuento celular utilizando el programa ImageJ.

### **2.6. Efecto de la transferencia de blastocistos provenientes de ratonas hiperglucémicas a ratonas pseudogestantes sanas**

Los blastocistos obtenidos mediante lavado oviductal y uterino de ratonas hiperglucémicas (ALX) y controles fueron sexados en el día 3,5 de desarrollo pre-implantacional y agrupados en igual cantidad de machos y hembras para luego ser transferidos a receptoras pseudogestantes sanas (11-15 semanas de edad, cruzadas con machos vasectomizados y con glucosa en sangre  $\leq 200$  mg/dL) a través de transferencias intrauterinas. Dichas ratonas fueron sacrificadas en el día 12 de gestación registrándose el sexo de aquellos fetos que habían implantado, así como identificando las posibles malformaciones del feto producto de la hiperglucemia pre-implantacional, y el número de reabsorciones.

### 3. Análisis estadístico

Todos los análisis de proporciones de sexos tanto primarias como secundarias se realizaron a través de una prueba de Chi-cuadrado con bondad de ajuste. En los casos de comparación de proporciones entre machos y hembras de distintos grupos experimentales se realizó una prueba *Z* con corrección de Yates. El número de células de los blastocistos se valoró mediante análisis de varianza de una vía (*one way ANOVA*). Además se realizó un *T-Test Mann-Whitney U Statistic*, para las comparativas de la concentración de glucosa en sangre. En los casos donde el valor de confianza fue superior al 95% se consideró como diferencia significativa. En las comparaciones estadísticas se utilizó el programa SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc).

## 4. Resultados

### 4.1. Efecto de la restricción de alimento pre-concepcional en la proporción de sexos y el tamaño de camada

#### 4.1.1. Restricción alimentaria pre-concepcional

Los resultados en la Tabla 1 muestran, que en las cepas CD1 y B6C3F1, la proporción de sexos de los fetos al día 12 de desarrollo, de los grupos de restricción de alimento de forma alternativa y los de disminución de alimento (8RF y 7F/2 respectivamente) no fueron diferentes a los obtenidos en los controles. Tampoco se encontró diferencias en la proporción de machos y hembras entre los dos grupos de restricción de alimento.

**Tabla 1. Proporción de sexos de ambos cuernos uterinos en los grupos de restricción alimentaria pre-concepcional (8RF, F/2) y control, en cepas CD1 y B6C3F1**

Grupos de restricción de alimento	Nº fetos implantados			Proporción de sexos Total	
	Total	Machos	Hembra	Machos	Hembra
<b>Cepa CD1</b>					
Control	394	191	203	48,0	52,0
8RF	235	119	116	51,0	49,0
<b>Cepa B6C3F1</b>					
Control	339	173	166	51,0	49,0
8RF	208	115	93	55,0	45,0
7F/2	231	114	117	49,0	51,0

Además considerando de forma independiente cada cuerno uterino, no se registró variación en la proporción de los sexos en la cepa CD1 ni en el útero derecho (machos: control 48% vs 8RF 54%) ni en el izquierdo (machos: control 48% vs 8RF 48%), como muestran las Tablas 2 y 3.

En cambio, en el útero derecho de la cepa B6C3F1 (Tabla 2), el grupo control muestra un patrón de segregación de sexos distinto a la proporción esperada (50:50), aumentando la proporción de machos hasta un 59%. Lo mismo ocurre con la dieta de alimento intermitente 8RF con resultados similares a los controles (58%). Sin embargo, el grupo 7F/2 no distorsiona la proporción de sexos, presentando diferencias significativas con el grupo control y con el de dieta intermitente 8RF ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2. Proporción de sexos del cuerno uterino derecho en cada grupo (8RF, F/2 y control) en cepas CD1 y B6C3F1**

Grupos	N° fetos útero derecho			Proporción de sexos útero derecho	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
<b>Cepa CD1</b>					
Control	200	97	103	48,0	52,0
8RF	111	60	51	54,0	46,0
<b>Cepa B6C3F1</b>					
Control	169	99	70	59,0 <sup>a</sup>	41,0 <sup>b</sup>
8RF	111	65	46	58,5 <sup>a</sup>	42,5 <sup>b</sup>
7F/2	115	58	57	50,4 <sup>c</sup>	49,6 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Muestran diferencias significativas,  $P < 0,05$ . N°: número de fetos implantados.

El cuerno uterino izquierdo de la cepa B6C3F1 también muestra un patrón de segregación en los controles diferente al esperado de 50:50, contrario a lo ocurrido en el cuerno uterino derecho, que aumenta la proporción de hembras en los controles. Por contra, en los grupos 8RF y

7F/2 las proporciones entre machos y hembras no muestran diferencias significativas, como se observa en la Tabla 3.

**Tabla 3. Proporción de sexos del cuerno uterino izquierdo en cada grupo (8RF, F/2 y control) en cepas CD1 y B6C3F1. N°: número de fetos implantados**

Grupos	N° fetos útero izquierdo			Proporción de sexos útero izquierdo	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
<b>Cepa CD1</b>					
Control	194	94	100	48,0	52,0
8RF	124	59	65	48,0	52,0
<b>Cepa B6C3F1</b>					
Control	170	74	96	44,0 <sup>a</sup>	56,0 <sup>b</sup>
8RF	97	50	47	51,5	48,5
7F/2	116	56	60	48,0	52,0

<sup>a,b</sup>Muestran diferencias significativas,  $P < 0,05$ .

Los resultados obtenidos debido al estrés por restricción de alimento en los tamaños de camadas totales y parciales de cada útero y en cada cepa estudiada se muestran en la Tabla 4. Se analizaron 48 camadas de la cepa CD1, donde no se observa un cambio en el tamaño total de camada del grupo de restricción alimentaria pre-concepcional 8RF, ni en los cuernos uterinos derecho e izquierdo por separado, comparado con lo observado del grupo control. Por otro lado, la cepa CD1 alberga mayor cantidad de crías tanto en útero derecho como en izquierdo en relación al tamaño de camada encontrado en la cepa B6C3F1 tanto en los grupos control como en los grupos de restricción de alimento. Por otro lado se analizaron 87 camadas en la cepa B6C3F1 donde en el grupo 7F/2 se encuentra un menor número de embriones implantados en el total de los cuernos uterinos comparados con el grupo control debido a la menor cantidad de implantaciones en el útero derecho ( $p < 0,05$ ), mientras que el grupo 8RF solo muestra una disminución no significativa de embriones en el útero izquierdo.

**Tabla 4. Número de fetos por camada en los cuernos uterinos derecho e izquierdo de los diferentes grupos de restricción de alimento pre-concepcional**

Cepas	Grupos de restricción de alimento	Nº camadas	Tamaño total de camada (Nº de fetos±SEM)	Cuerno uterino derecho (Nº de fetos±SEM)	Cuerno uterino izquierdo (Nº de fetos±SEM)
<b>CD1</b>	Control	30	13,13±0,65	6,67±0,55	6,47±0,41
	8RF	18	13,06±0,91	6,89±0,52	6,17±0,73
<b>B6C3F1</b>	control	38	8,92±0,53 <sup>a</sup>	4,47±0,29	4,45±0,31
	8RF	24	8,66±0,81 <sup>ab</sup>	4,62±0,48	4,04±0,46
	7F/2	28	8,25±0,36 <sup>b</sup>	4,14±0,34	4,11±0,27

<sup>a,b</sup>Muestran diferencias significativas, P<0,05.

#### **4.1.2. Proporción primaria de sexos por restricción de alimento pre-concepcional durante la superovulación**

La restricción de alimento durante la superovulación, entre las inyecciones intraperitoneales de PMSG (eCG) y hCG, no afectó la proporción de sexos de los blastocistos de la cepa CD1 (Tabla 5A); y tampoco se observaron diferencias en la proporción de sexos de los blastocistos obtenidos de cada cuerno uterino evaluados de manera independiente derecho (Tabla 5B) e izquierdo (Tabla 5C) con respecto a sus controles.

**Tabla 5. Proporción global de sexos (A) de blastocistos y provenientes de oviducto derecho (B) e izquierdo (C) de ratonas CD1 superovuladas y sometidas a restricción de alimento pre-concepcional**

A.

CD1	N° embriones totales			Proporción de sexos total	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Control SOV	1123	547	576	49,0	51,0
eRh	848	444	404	52,0	48,0

B.

CD1	N° embriones derecha			Proporción de sexos ovario derecho	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Control SOV	603	283	320	47,0	53,0
eRh	423	215	208	51,0	49,0

C.

CD1	N° de embriones izquierda			Proporción de sexos ovario izquierdo	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Control SOV	567	289	278	51,0	49,0
eRh	425	229	196	54,0	46,0

SOV: superovulación, eRh: grupo con restricción de alimento entre la administración de PMSG y hCG.

**4.2.- Efecto de la restricción de alimento y la diabetes químicamente inducida en el periodo pre-implantacional en la proporción de sexos y en la recuperación y calidad de embriones/fetos**

**4.2.1. Proporción secundaria de sexos por restricción de alimento pre-implantacional**

En este análisis, se retiró el alimento a las hembras de las cepas CD1 y B6C3F1, en el tercer y cuarto día de su desarrollo pre-implantacional (grupo R<sub>3-4</sub>) y luego se sacrificaron al día 12 de gestación para registrar el porcentaje de sexos y tamaño de camada de forma total y parcial en los fetos implantados en cada cuerno uterino. Comparados con los controles, no se encontró una diferencia en la proporción total de los sexos en ambas cepas por la restricción de alimento practicado en estadios embrionarios cercanos a la implantación (Tabla 6).

**Tabla 6. Proporción de sexos de ambos cuernos uterinos en restricción de alimento pre-implantacional**

Grupos	N° fetos			Proporción de sexos Total (%)	
	Total	Machos	Hembra	Machos	Hembra
<b>Cepa CD1</b>					
Control	394	191	203	48,0	52,0
R <sub>3-4</sub>	196	101	95	52,0	48,0
<b>Cepa B6C3F1</b>					
Control	339	173	166	51,0	49,0
R <sub>3-4</sub>	170	84	86	49,0	51,0

R<sub>3-4</sub>: grupo con restricción de alimento en el tercer y cuarto día del periodo pre-implantacional.

Cuando analizamos los resultados considerando cada cuerno uterino (Tabla 7), se observa que la restricción de alimento no afecta a la cepa CD1. En cambio, en la cepa B6C3F1, la restricción de alimento causa un desequilibrio diferencial entre machos y hembras. Se aprecia en

el útero derecho un efecto contrario entre el control, donde hay mayor proporción de machos y el grupo de restricción de alimento, donde hay mayor proporción de hembras. En cambio en el lado izquierdo, solo el grupo control alberga mayor cantidad de hembras, mostrando el grupo de restricción de alimento una tendencia contraria al grupo control (Tabla 7).

**Tabla 7. Proporción de sexos del cuerno uterino derecho e izquierdo en restricción de alimento pre-implantacional en cepas CD1 y B6C3F1**

Grupos	N° fetos útero derecho			Proporción de sexos útero derecho	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
<b>Cepa CD1</b>					
Control	200	97	103	48,0	52,0
R <sub>3-4</sub>	100	55	45	55,0	45,0
<b>Cepa B6C3F1</b>					
control	169	99	70	59,0 <sup>a</sup>	41,0 <sup>b</sup>
R <sub>3-4</sub>	70	28	42	40,0 <sup>b</sup>	60,0 <sup>a</sup>
	N° fetos útero izquierdo			Proporción de sexos útero izquierdo	
<b>Cepa CD1</b>	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Control	194	94	100	48,0	52,0
R <sub>3-4</sub>	96	46	50	48,0	52,0
<b>CepaB6C3F1</b>					
control	170	74	96	44,0 <sup>a</sup>	56,0 <sup>b</sup>
R <sub>3-4</sub>	100	56	44	56,0 <sup>b</sup>	44,0 <sup>a</sup>

R<sub>3-4</sub>: grupo con restricción de alimento en el tercer y cuarto día de pre-implantación. <sup>a,b</sup>Muestran diferencias significativas, P<0,05.



En relación al tamaño de camada (Tabla 8) no se observan diferencias en la cepa CD1, sin embargo, cuando se analizan en la cepa B6C3F1, en el grupo R<sub>3-4</sub> hay diferencias con el control en el total y en cada uno de los cuernos uterinos.

**Tabla 8. Número de fetos por camada en los cuernos uterinos derecho e izquierdo del restricción de alimento pre-implantacional en cepas CD1 y B6C3F1**

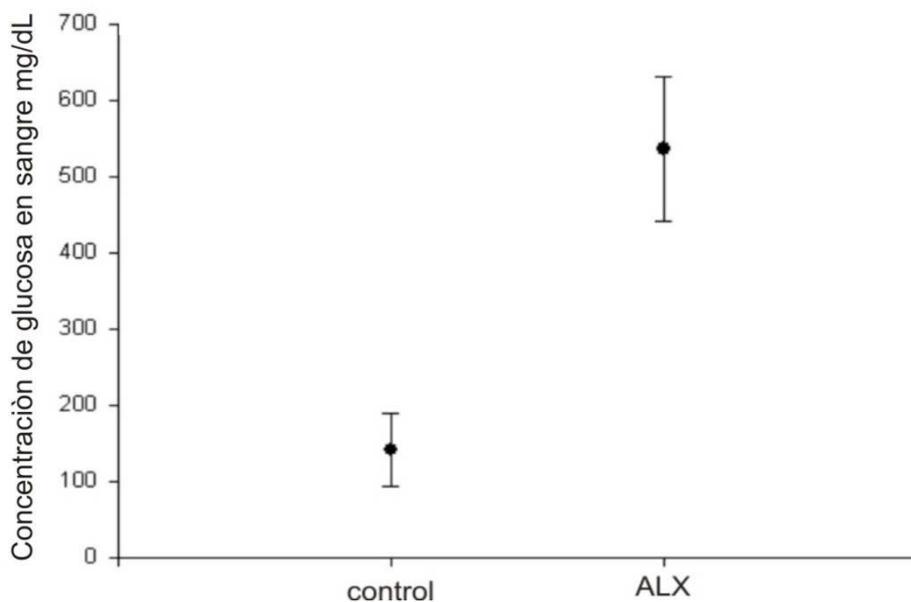
Grupos	Nº camadas	Tamaño total de camada	Cuerno uterino derecho	Cuerno uterino izquierdo
<b>Cepa CD1</b>				
Control	30	13,13±0,85	6,90±0,51	6,47±0,41
R <sub>3-4</sub>	17	11,12±0,91	5,82±0,40	5,29±0,70
<b>Cepa B6C3F1</b>				
control	38	8,92±0,24 <sup>a</sup>	4,65±0,29 <sup>a</sup>	4,27±0,3 <sup>a</sup>
R <sub>3-4</sub>	22	6,73±0,44 <sup>b</sup>	3,48±0,28 <sup>b</sup>	3,25±0,38 <sup>b</sup>

R<sub>3-4</sub>: grupo con restricción de alimento en el tercer y cuarto día de pre-implantación. <sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas, P<0,05

## 4.2.2.- Proporción primaria de sexo y tasa de recuperación de embriones provenientes de madres diabéticas

### 4.2.2.1. Proporción primaria de sexos

Las ratonas fueron inyectadas i.p. con aloxano (ALX, Sigma A7413-10G) previamente a la inyección de hCG. Después de 84 horas, los animales presentaron altas concentraciones de glucosa en sangre ( $\geq 400$  mg/dL), muy superiores a los controles ( $\leq 200$  mg/dL) (Figura 2).



**Figura 2.** Rango de concentración de glucosa en sangre (mg/dL) de ratonas inyectadas i.p con aloxano (ALX), y controles al momento de la recuperación de los blastocistos (Día 3,5 de desarrollo pre-implantacional). Normogluceemia  $\leq 200$  mg/dL, hipergluceemia  $\geq 400$  mg/dL. T-Test Mann-Whitney U Statistic con  $P < 0,001$ .

Cuando se analizaron los resultados de proporción total del sexo, se observó una distorsión positiva del sexo debido a la administración de ALX ( $p < 0,05$ ) (Tabla 9), igual que cuando se analizó de manera independiente el oviducto izquierdo ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias no fueron tan visibles en el oviducto derecho, donde se incrementó ligeramente el porcentaje de machos sin llegar a ser la diferencia estadísticamente significativa (Tabla 9).

**Tabla 9. Proporción primaria de sexos en estadio de blastocisto de día 3,5 recuperados de hembras CD1 sanas e hiperglucémicas, de los oviductos derecho e izquierdo**

Grupos	N° de embriones recuperados			Proporción de sexototales	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Control CD1	229	122	107	53,0	47,0
ALX CD1	425	236	189	55,0 <sup>a</sup>	45,0 <sup>b</sup>
				<b>Oviducto derecho</b>	
Control CD1	121	61	60	50,0	50,0
ALX CD1	209	111	98	53,0	47,0
				<b>Oviducto izquierdo</b>	
Control CD1	108	59	49	54,0	46,0
ALX CD1	216	125	91	58,0 <sup>a</sup>	42,0 <sup>b</sup>

ALX: aloxano. <sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas, P<0,05.

#### 4.2.2.2. Número de blastocistos recuperados de ratonas diabéticas

Para determinar la proporción primaria de los sexos en ratonas inyectadas con ALX, se les realizó lavados a través del infundíbulo hasta la parte terminal del útero, con el objetivo de recuperar todos los embriones, tanto los que se desarrollaron hasta blastocisto como los que estuvieran en estadios de desarrollo anterior. Posteriormente se determinó su sexo mediante luz ultravioleta y se registraron las proporciones procedentes de cada oviducto. No se encontraron diferencias significativas en el número de embriones recuperados con respecto a los controles (Tabla 10) aunque se observó un menor número de blastocistos recuperados de las ratonas tratadas con aloxano (Tabla 10).

**Tabla 10. Número de blastocistos recuperados de los oviductos derecho e izquierdo en día 3,5 post-inyección de hCG de ratonas hiperglucémicas (ALX) ( $\geq 400$  mg/dL) y normoglucémicas (Control) ( $\leq 200$  mg/dL)**

Grupos	n	Nº de embriones recuperados/ratona	Recuperados de oviducto derecho	Recuperados de oviducto izquierdo
Control ( $\leq 200$ mg/dL)	8	28,63 $\pm$ 5,72	15,13 $\pm$ 3,54	13,5 $\pm$ 3,54
ALX ( $\geq 400$ mg/dL)	19	26,71 $\pm$ 2,79	13,77 $\pm$ 1,99	13,94 $\pm$ 1,34

n: número de ratonas, ALX: aloxano.

#### **4.2.3. Calidad embrionaria en condiciones de hiperglucemia y supervivencia después de su transferencia a ratonas sanas: tasa de implantación y anomalías fetales**

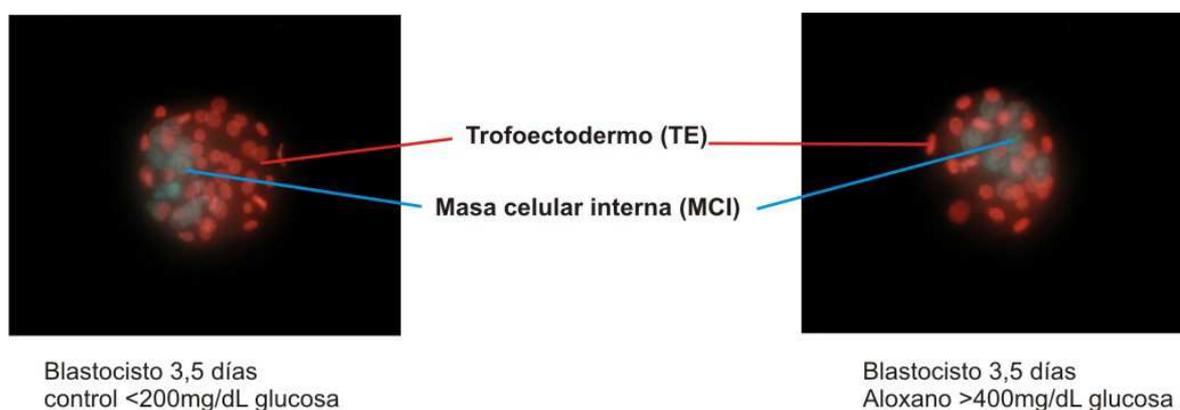
##### **4.2.3.1. Número de células del trofotodermo (TE) y de la masa celular interna (MCI) de blastocistos obtenidos de hembras tratadas con aloxano (ALX)**

Se recuperaron blastocistos de las ratonas sometidas a ALX con el fin de determinar la cantidad de células que pudieran perderse debido a las condiciones apoptóticas del medio hiperglucémico donde se desarrollaron. Para ello, se procedió con tinciones diferenciales de masa celular interna y de trofotodermo. Para los embriones machos se encontraron diferencias tanto en la MCI como en el total de células. En cambio en el caso de los embriones hembra solo se observaron diferencias en el número de células de la MCI (Tabla 11 y Figura 3 y 4).

**Tabla 11. Recuento celular de blastocistos machos y hembra sometidos a un ambiente hiperglucémico (promedio celular  $\pm$  SEM)**

	n	Número de células totales		N° células trofoectodermo		N° células MCI	
		Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
<b>Control CD1</b>	45	51,86 $\pm 2,96^a$	46,39 $\pm 1,96$	37,18 $\pm 2,35$	33,22 $\pm 1,46$	14,68 $\pm 0,88^c$	13,17 $\pm 0,75^a$
<b>ALX CD1 <math>\geq 400</math> mg/dL</b>	36	44,37 $\pm 2,38^b$	41,82 $\pm 2,62$	34,21 $\pm 2,04$	30,29 $\pm 2,28$	10,16 $\pm 0,62^d$	11,53 $\pm 0,54^b$

ALX: aloxano, n: número de embriones, MCI: masa celular interna. Muestran diferencias significativas las letras a,b con  $p < 0.05$ ; y c,d con  $p < 0.01$ .



**Figura 3: Tinción diferencial de blastocistos de ratón, control y expuesto a aloxano. Se observa una pérdida celular en la masa celular interna y trofoectodermo en los expuestos a aloxano**

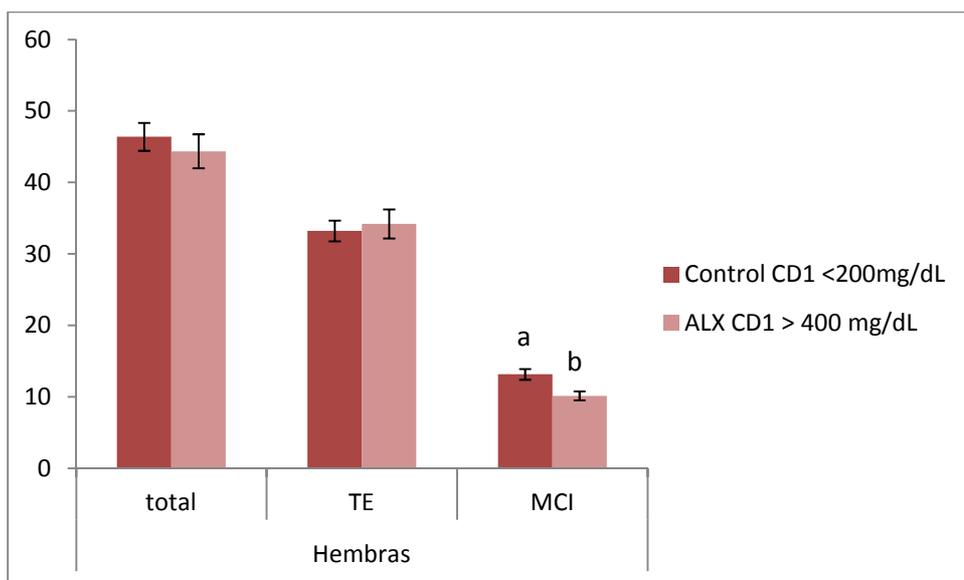
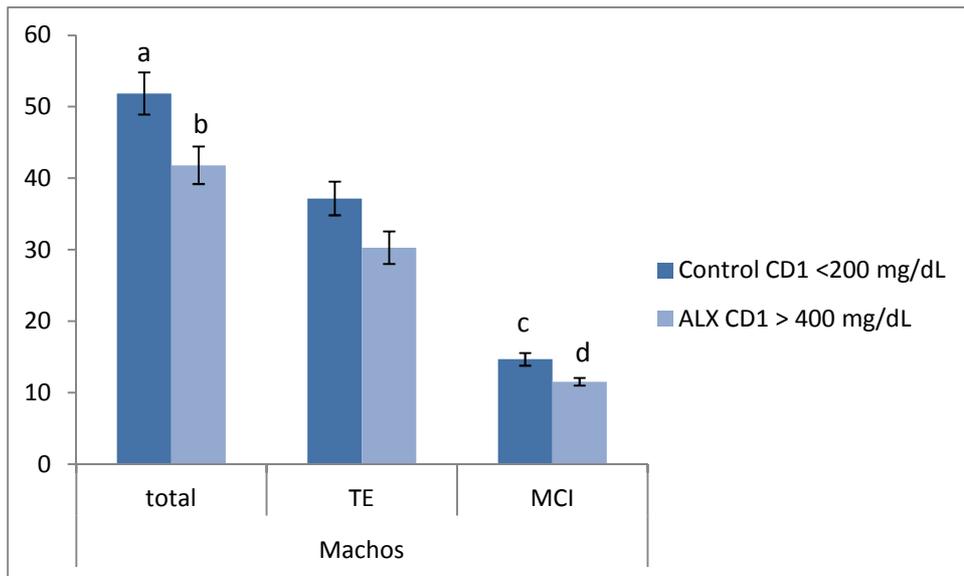


Figura 4. Recuento celular de blastocistos machos y hembras en los grupos control y grupo ALX. Se observan diferencias en las células de la masa celular interna de machos y hembras, y en el total en machos. Muestran diferencias significativas las letras a-b:  $p < 0,05$  y c-d:  $p < 0,01$ .

#### 4.2.3.2. Transferencia de embriones de madres hiperglucémicas a receptoras sanas

Una vez determinado el sexo de los blastocistos procedentes de la madre que estuvo expuesta a la dosis de aloxano hasta las etapas finales pre-implantacionales (día 3,5 de desarrollo), se recuperaron los blastocistos, y seguidamente se transfirieron igual cantidad de machos y hembras (6M+6H) a úteros de ratonas pseudogestantes no hiperglucémicas ( $\leq 200$  mg/dL de concentración de glucosa en sangre). A continuación, se sacrificaron a las ratonas en el día 12 de gestación. Se observó una mayor implantación de embriones procedentes de madres control que de madres hiperglucémicas (Tabla 12), aunque ninguno de los dos sexos se vio significativamente afectado.

Algunos estudios han reportado diversas alteraciones en el desarrollo y crecimiento de determinados órganos como espina bífida o exencefalia debido a la alta exposición pre-implantacional de los embriones a un ambiente uterino hiperglucémico (Machado et al. 2001). Por ello, se realizó una inspección anatómica superficial a los fetos de nuestro estudio con una lupa estereoscópica, aunque no se apreciaron defectos congénitos o anomalías en ellos.

**Tabla 12. Proporción de fetos implantados provenientes de embriones transferidos macho y hembra (1:1) de forma simultánea a ratonas pseudogestantes sanas**

	Total de blastocistos transferidos (M+H)		% Implantación a Día 12 de desarrollo		
	Macho (n)	Hembra (n)	Fetos macho (%)	Fetos hembra (%)	Total
<b>Control</b>	50	50	24 (48)	28 (56)	52 (52%) <sup>a</sup>
<b>ALX</b>	50	50	16 (32)	21 (42)	37 (37%) <sup>b</sup>

ALX: aloxano, n: número de embriones transferidos, M+H: machos y hembras, %: porcentaje.

## 5.- Discusión

Las teorías evolutivas acerca de la divergencia en la proporción del sexo han sido ampliamente discutidas en varios modelos animales, y se han intentado esclarecer en base a la alteración de diferentes factores implicados en el proceso de la reproducción. La teoría de la condición corporal materna (Trivers y Willard 1973) es una de las más aceptadas, aunque existen otras teorías como la competición por el recurso (*Local Resource Enhancement* LRE o *Local Resource Competition* LRC, respectivamente) (Fisher 1930), o por el apareamiento (*Local Mate Competition*, LMC) (Hamilton 1967). Según la hipótesis de Trivers-Willard, la madre podría influir en el sexo del bebé antes del nacimiento dependiendo de los factores ambientales. Esto se traduciría en que en condiciones adversas nacerían más niñas y en condiciones mejores nacerían más niños (Wallner et al. 2012). Por ejemplo, se ha descrito que la dieta afecta la proporción primaria y secundaria del sexo, sin embargo muchas veces los resultados son contradictorios (Rosenfeld et al. 2003, Baker 2005). Los distintos nutrientes que rigen la constitución materna, y las alteraciones que sufre la homeostasis oviductal y uterina sobre el embrión o sobre los espermatozoides pueden ser la causa de la alteración. La influencia de la concentración de glucosa en el medio ambiente embrionario pre-implantacional en periodos cercanos al tiempo de inseminación e implantación, ha sido reportada por algunos autores como las que tienen mayor correlación con el mecanismo de distorsión del equilibrio teórico de los sexos (Cameron 2004). Muchas de las estrategias realizadas se basan en generar estrés en momentos clave de la generación embrionaria y vida fetal. Por ello, las restricciones de alimento en los tiempos de producción ovocitaria, pre-concepcional o pre-implantacional (determinación primaria del sexo) y durante el desarrollo fetal (determinación secundaria del sexo) representarían un buen modelo de estrés hipoglucémico y metabólico en general.

En nuestro desarrollo experimental, se sometieron a ratones hembras a una restricción de alimento programada en estas etapas clave, utilizando dos cepas que muestran condiciones corporales distintas y *background* genético distinto. Así, la cepa no consanguínea CD1, es más grande y almacena mayor cantidad de grasa a medida que envejece (aproximadamente una ratona reproductivamente adulta a las 6 semanas pesa entre  $26,5 \pm 1,5$  gramos (Fuente: Laboratorios Harlan). Además puede albergar una gran cantidad de fetos en su útero (10-14 crías por camada) (Bechard et al. 2012) y al término de la preñez tienen un comportamiento maternal

más notorio (evitan el canibalismo de crías en tamaños de camadas pequeñas, e inclusive aceptan crías de diferentes cepas). Además presentan un comportamiento más sosegado que las B6C3F1 (cruce de dos cepas consanguíneas), las cuales son más pequeñas a lo largo de su vida, (a las 7 semanas aproximadamente pesan  $15,42 \pm 0,89$  gramos, - Fuente: Laboratorios Harlan -), con mayor comportamiento de estereotipia por estrés y con una menor capacidad uterina para llevar a término preñeces de grandes camadas (media de 6-8 crías por camada); (Bechard et al. 2012). Cuando analizamos los efectos producidos por la falta de alimento sobre la proporción del sexo primario y secundario en ambas líneas de ratón, observamos que ninguna de las dietas propuestas modificó significativamente el porcentaje de sexos esperados (en torno al balance proporcional 50:50 de machos y hembras), ni en CD1 ni en B6C3F1, cuando se registraron los sexos de los fetos de sumando ambos cuernos uterinos en condiciones de monta natural. Sin embargo, se observó una diferencia entre cepas cuando se analizaron los cuernos uterinos por separado (tanto derecho como izquierdo de forma independiente), lo cual también se ha reportado en la especie bovina (Hylan et al. 2009).

En principio pensábamos que la restricción alternativa de alimento 8RF podría ser más estresante que la del grupo 7R/2, debido a la carencia de alimento en lapsos de un día tomados de forma intermitente. Sin embargo, en nuestro caso, cuando se analiza el total de fetos, sin considerar el útero de origen, no se observa alteración en la proporción de sexo, y solo hay una pequeña disminución del tamaño de camada en el grupo 7F/2. Sin embargo al analizar los cuernos uterinos por separado se observa que en el cuerno derecho el grupo 7F/2 es distinto al grupo control y 8RF, y en el cuerno izquierdo los dos grupos de restricción son distintos al control. Estas diferencias se correlacionan con la disminución del número de fetos observados en cada respectivo cuerno uterino, indicando que en el cuerno izquierdo se produce una pérdida de hembras en ambos grupos de restricción y en el derecho se produce una pérdida de machos en el grupo 7F/2. El dato que la restricción 7F/2 sea más estresante que la 8RF lo constatamos también con el hecho de que no pudimos realizar este grupo experimental con los ratones CD1, que por su condición corporal soportaban muy mal este desajuste nutricional y llegaban en algunos casos al canibalismo, por lo que decidimos no realizar esta dieta en la cepa CD1.

La presencia de fetos machos en mayor proporción en el cuerno derecho que en el izquierdo ha sido reportado anteriormente en diferentes especies de mamíferos, como en el ratón (Hollander 1950, Falconer et al. 1961), la rata (Buchanan 1974), el hámster (O y Chow 1987), en

cerdos (Riboni 2002), en bovinos (Hylan et al. 2009) y en conejillos de indias (Clark y Galef 1990), entre otras (Endo et al. 1987, Clark y Galef 1990). Estas publicaciones se basaron en la existencia de un mayor número de cuerpos lúteos e implantaciones de fetos en el lado derecho en comparación con el izquierdo. También en la mujer se ha observado este fenómeno, donde la mayor parte de los ovocitos ovulados proceden del ovario derecho (Fukuda et al. 2000). Sin embargo, otros autores sostienen que los estudios donde se encontraba una diferencia bilateral ovárica podrían tener resultados sesgados debido a que fueron realizados en poblaciones con sospecha de infertilidad, baja respuesta folicular y ovulatoria y/o problemas de implantación y de gestación. Es más, se obtuvieron distintos datos cuando se realizaron estos estudios con mujeres sanas, las cuales no presentaban diferencia entre los ovarios derecho e izquierdo en cuanto a la respuesta por estimulación ovárica, tasa de ovulación, calidad, porcentaje de fecundación, división y tasa de preñez (Balasch et al. 1994). Nosotros hemos observado una tendencia en este experimento a tener más implantaciones el cuerno derecho que el izquierdo, pero las diferencias no eran significativas.

En el útero izquierdo los controles sufren una disminución en la proporción del sexo, contrario a lo que ocurre en el útero derecho. Por ello cuando se toman las proporciones a nivel global no se encuentran diferencias. En cambio, en el grupo 8RF y 7F/2, no se observa el incremento de hembras en el izquierdo. Si el ovario izquierdo ovula más tarde y tiene más posibilidades de ser fecundado por espermatozoides portadores del cromosoma X, es más probable que sea un embrión hembra el que en condiciones de restricción de alimento tenga más problemas para generarse y por eso se observa menor número de implantaciones en ese cuerno. De forma equivalente, si el ovario derecho ovula antes y sus ovocitos tienen más posibilidades de ser fecundados por espermatozoides portadores del cromosoma Y, también es más probable que en condiciones de restricción se produzcan menos embriones de sexo masculino, y esto es justamente lo que se observa para el grupo más estresante 7F/2.

Si la restricción de alimento se realiza en etapas pre-implantacionales (grupo R<sub>3-4</sub>) no se encuentran diferencias en la distorsión secundaria del sexo en el global de ambos cuernos uterinos en las dos cepas de estudio, así como tampoco en los úteros tomados por separado de la cepa CD1. Sin embargo en la cepa B6C3F1 en condiciones de restricción, se ve muy disminuida la proporción de machos en el útero derecho e incrementado en el útero izquierdo comparado con los controles, con menor implantación de fetos en ambos úteros. La pérdida de fetos en

condiciones de restricción podría explicar la disminución de la proporción de sexo en el útero derecho y el aumento en el izquierdo. Nuestros resultados coinciden con trabajos previos en rata y hámster donde ha sido descrito que el ovario derecho ovula más y produce a término mayor cantidad de machos, y que a su vez en el útero derecho hay mayor pérdida de fetos machos que hembras (Pratt y Lisk 1991, Bacon y McClintock 1999). En los cruces donde se indujo la ovulación, el porcentaje primario del sexo en la cepa CD1 no se modificó ni en los blastocistos totales obtenidos ni en los recuperados por cada útero. La restricción de alimento para la cepa CD1 no dio lugar a una modificación de las cantidades de machos y hembras, correlacionándose los resultados con los obtenidos por Sakai, donde tampoco se reportó un cambio importante (Sakai y Endo 1987).

Cuando se recuperaron los embriones provenientes de superovulación en un ambiente hiperglucémico en la cepa CD1, el porcentaje global de machos se incrementó, debido principalmente a la mayor proporción de machos recuperados en el oviducto izquierdo. En un estudio previo realizado en ratones sometidos a aloxano en montas naturales, observaron que el porcentaje secundario global de sexos aumentaba (Machado et al. 2001). Sostuvieron igualmente que la causa de sus resultados se debieron al aloxano, el cual tenía una influencia sobre la generación de embriopatías que derivaban en alta mortalidad fetal por la generación de anomalías congénitas (como espina bífida o exencefalías) (Machado et al. 2001). En nuestro caso, nosotros observamos que la exposición a aloxano en periodos cercanos a la implantación no afecta el número de embriones recuperados comparados con los controles. Para tratar de explicar esta diferencia, se analizó la calidad de los blastocistos machos y hembras en términos de número de células y viabilidad a implantar. La exposición a aloxano redujo significativamente la masa celular interna de machos y hembras comparados con el control. Esto se puede explicar por efecto de la apoptosis que afecta preferencialmente a la MCI (Perez-Crespo et al. 2005). Además el efecto era más evidente en machos donde también el número de células total disminuye. Por otra parte, corroborando lo descrito en estudios anteriores sobre la teratogenicidad del aloxano (Takano et al. 1965, Machado et al. 2001), se recuperaron menos fetos implantados del grupo de embriones procedentes de madres tratadas con aloxano. Por lo cual de nuestros datos podemos inferir que si bien se recupera el mismo número de embriones pre-implantacionales, las calidades embrionarias son menores, lo cual se evidencia por la reducción del número de las células de la MCI. En conclusión, en este trabajo observamos que hay una distorsión de la determinación del sexo primario y secundario en momentos próximos a

la pre-concepción y peri-implantación cuando se genera una restricción programada de alimentos, únicamente cuando se considera a cada cuerno uterino de forma independiente. Además, esto afecta de forma significativa a las hembras de menor condición corporal. Por último, la hiperglucemia en el día 3 y 4 de desarrollo pre-implantacional aumenta la proporción de blastocistos machos debido probablemente a la disminución de la viabilidad de los embriones hembra y disminuye la implantación embrionaria.

# Capítulo III

**Distribución de las implantaciones fetales en hembras ovariectomizadas, en relación con la proporción de sexos de acuerdo a la lateralidad del oviducto o cuerno uterino de origen**



---

## INTRODUCCIÓN

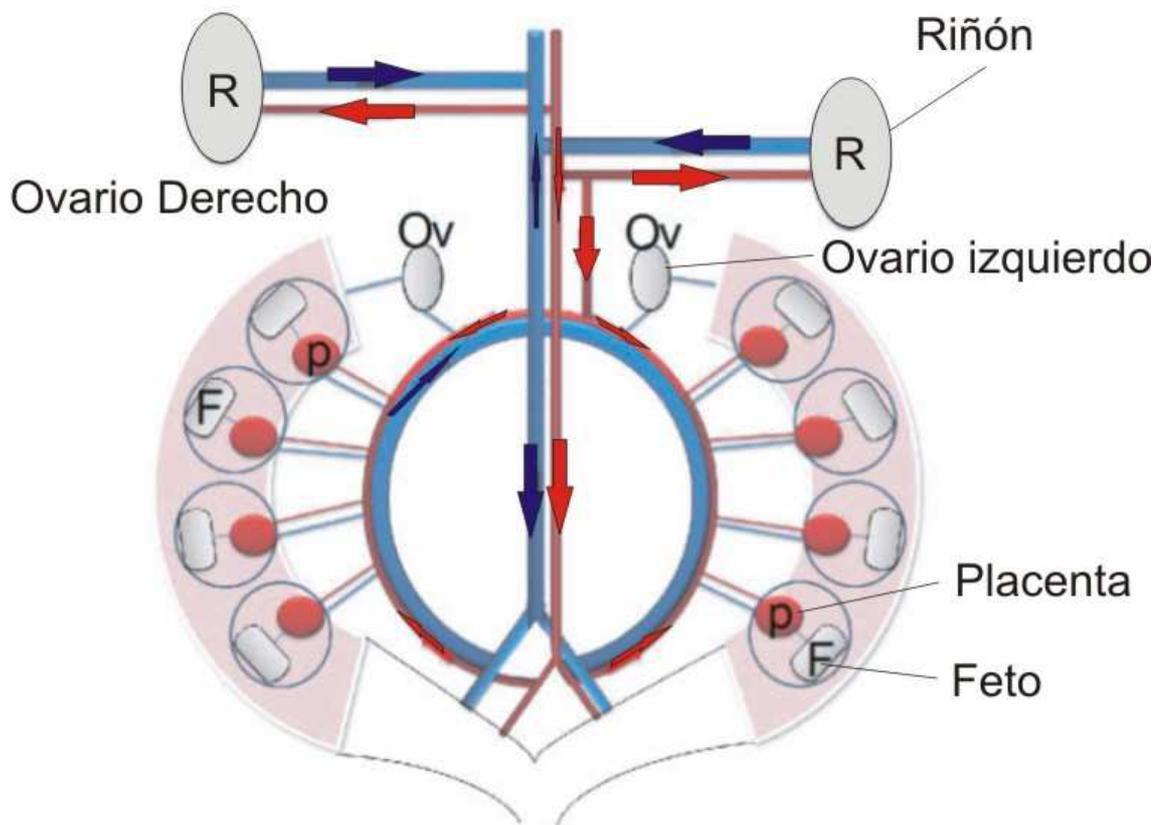
Los vertebrados poseen una simetría bilateral en la organización externa del cuerpo. Sin embargo, muchos de los órganos internos son asimétricos, como el corazón, hígado, páncreas, etc. Y otros órganos internos son pares pero presentan un desarrollo asimétrico, tales como las estructuras encargadas del proceso de la reproducción. El funcionamiento de estos órganos no se rige de acuerdo al aporte del 50% de cada componente, sino que varía entre cada órgano y, en su conjunto, mantienen la homeostasis deseada. Es por ello que si se observan de forma independiente, cada uno puede comportarse de manera diferente a su par (Levin 2005). En muchos de los casos de actuación dual de los órganos, como es el caso de los órganos de la reproducción, la falta de uno de ellos hace que el sistema se adapte tratando de compensar esa carencia y procurando mantener el equilibrio funcional. Sin embargo, estas alteraciones consiguen un cambio y una modificación del organismo, que a su vez generan nuevos cambios y alteraciones colaterales en su fisiología (Hollander 1950, McLaren 1963, Pepler 1971, Baker et al. 1980, Burden et al. 1986, Chávez y Domínguez 1994, Hylan et al. 2009).

Muchos autores coinciden en que cada uno de los ovarios y los cuernos uterinos se comportan de manera distinta durante la vida reproductiva (Hollander 1950, Yamanakay Soderwall 1960, Falconer et al. 1961, Casida et al. 1966, Reimers et al. 1973, Buchanan 1974, Baird y Birney 1985, O y Chow 1987, Wiebold y Becker 1987, Clark y Galef 1990). Así, se sugiere que el ovario derecho genera mayor producción de folículos capaces de madurar y ovular en comparación con el ovario izquierdo. Esta diferencia se ha descrito con anterioridad en muchas especies, como en el ratón (Hollander 1950, Falconer et al. 1961), la rata (Buchanan 1974), el hámster (O y Chow 1987), en cerdos (Riboni 2002), en bovinos (Hylan et al. 2009) y en conejillos de indias (Clark y Galef 1990) entre otras. Estas publicaciones se basaron en la existencia de un mayor número de cuerpos lúteos e implantaciones de fetos en el lado derecho en comparación con el izquierdo. También en la mujer se ha observado este fenómeno, donde la mayor parte de los ovocitos ovulados proceden del ovario derecho (Fukuda et al. 2000). Sin embargo, otros autores sostienen que los estudios donde se encontraba una diferencia bilateral ovárica podrían tener resultados sesgados debido a que fueron realizados en poblaciones con sospecha de infertilidad, baja respuesta folicular y ovulatoria y/o problemas de implantación y de gestación. Es más, se obtuvieron

distintos datos cuando se realizaron estos estudios con mujeres sanas, las cuales no presentaban diferencia entre los ovarios derecho e izquierdo en cuanto a la respuesta por estimulación ovárica, tasa de ovulación, calidad, porcentaje de fecundación, división y tasa de preñez (Balasch et al. 1994).

En pequeños rumiantes como las ovejas, el 55-65% de ovulaciones y preñeces se presentaron en el ovario y útero derecho (Casida et al. 1966, Reimers et al. 1973). El motivo de estas diferencias parece estar respaldado anatómicamente, debido a que el lado derecho es el lugar opuesto al rumen, y precisamente la ubicación anatómica del rumen hace decrecer el flujo sanguíneo en el lado izquierdo, teniendo influencia sobre la cantidad de gonadotropinas que recibe el ovario izquierdo. Pese a que esta justificación no sería aplicable a roedores, en éstos se ha observado en general que existen diferencias en la población ovocitaria y suministro sanguíneo, influenciada posiblemente por la inervación vagal que puede afectar diferencialmente a las poblaciones ovocitarias del lado derecho e izquierdo (Hollander 1950, Yamanaka y Soderwall 1960, Falconer et al. 1961, Casida et al. 1966, Reimers et al. 1973, Buchanan 1974, Baird y Birney 1985, Burden et al. 1986, O y Chow 1987, Wiebold y Becker 1987, Clark y Galef 1990).

Según la anatomía del ratón, el suministro de sangre al ovario y cuerno uterino izquierdo se origina de una rama de la arteria renal, mientras que el suministro al ovario y cuerno uterino derecho se origina directamente de la aorta descendente (Figura 1) (Avni et al. 2012, Raz et al. 2012). En cambio en la mujer el flujo sanguíneo diferencial que reciben los ovarios y los úteros, se daría de la siguiente manera: mientras que ambos ovarios reciben el suministro sanguíneo de las arterias ováricas provenientes de la arteria aorta, el riego de las venas presenta diferencias en el lado derecho, donde se drenan directamente de la vena cava inferior. En el lado izquierdo, primero se drena a la vena renal izquierda, para luego pasar por la vena cava inferior. Además, las diferencias anatómicas espaciales de estas estructuras podrían generar distinto tipo de flujo, debido a que el ovario izquierdo se recuesta sobre el colon sigmoideo, mientras que en el lado derecho el ovario se encuentra adyacente al ciego y al apéndice. Esto produciría las supuestas diferencias en la irrigación ovárica (Thomson et al. 2001).



**Figura 1.** Esquema de la distribución sanguínea en los lados derecho e izquierdo de una ratona gestante. El suministro de sangre al ovario y cuerno uterino izquierdo se origina de una rama de la arteria renal, mientras que el suministro al ovario y cuerno uterino derecho se origina directamente de la aorta descendente.

Algunos autores consideran que las diferencias en el riego podrían incrementar o adelantar la presencia de LH y FSH en el ovario derecho, con lo que se explicaría su mayor tasa de ovulación y/o una asincronía del momento de ovulación (Wiebold y Becker 1987). Por otra parte las diferencias en riego en el útero podrían crear una diferencia en la capacidad de implantación y desarrollo entre ambos cuernos uterinos, e incluso entre distintas regiones uterinas.

Cuando se extirpa un ovario en ratón, rápidamente se producen cambios dramáticos en el otro ovario, doblando su tamaño y funcionalidad en una semana, y finalmente produciendo la misma cantidad de ovocitos que producían los dos ovarios. En otras

especies como en porcino, también se ha observado que la falta de un ovario no alteraba el tamaño de camada (Hunter 1787). Actualmente se conoce que, tras una ovariectomía unilateral, tiene lugar una hipertrofia del ovario remanente, el cual produce una alta respuesta hormonal compensatoria (Hollander 1950, McLaren 1963, Pepler 1971, Baker et al. 1980, Burden et al. 1986), además de un incremento en la obesidad y un desajuste hormonal y fisiológico de la hembra (Kaaja 2008). Se ha descrito tal compensación en diversas especies como el ratón (Baligar y Kaliwal 2004), la rata (Trujillo et al. 2004), la oveja (Mallampati y Casida 1970), el conejillo de Indias (Riboni 2002), y en bovinos (Johnson et al. 1985, Fry et al. 1987). Más aun, cuando se midieron las concentraciones de hormona luteinizante (LH) en ratas hemiovariectomizadas, se observó que estas eran mucho mayores que las de ratas con ovarios intactos. De hecho, en el ovario remanente, las altas concentraciones de LH y hormona foliculo-estimulante (FSH) potencian una compensación ovocitaria y un incremento de la tasa de ovulación e implantación (Wiebold y Becker 1987). Se ha descrito que las tasas de ovulación fueron mayores cuando se extirpa el ovario izquierdo en lugar del derecho (Wiebold y Becker 1987), y que cuando se realizaba una ovariectomía unilateral en el tercer día de gestación se producía una alta mortalidad de los embriones en el cuerno ipsilateral al ovario, en comparación con el contralateral intacto (Bruce et al. 1968). Debido a esta compensación, la tasa de ovulación y el número de gestaciones en mujeres hemiovariectomizadas se mostraron con niveles similares a los embarazos de mujeres con los dos ovarios intactos (Boutteville et al. 1987).

En consecuencia y de forma general, se ha evidenciado que existe en múltiples especies una asimetría bilateral entre los ovarios y úteros que permite un distinto desarrollo folicular (Casida et al. 1966, Fukuda et al. 2000), variable cantidad embrionaria pre-implantacional (Hylan et al. 2009), variable éxito de implantación (Baird y Birney 1985) y una distribución intrauterina distinta de los fetos (Clark y Galef 1990). Igualmente, puede provocar un flujo sanguíneo cambiante que condicione un efecto sobre el embrión/feto mediante la concentración de gonadotropinas y dosis hormonales, las cuales pueden influir a su vez en la distorsión de la proporción del sexo de los embriones a implantar o en los fenotipos de los fetos a desarrollar dentro de la camada (Clark y Galef 1990). Por lo tanto, son muchos los estudios que muestran esta

disparidad anatómico-fisiológica del ovario y útero de acuerdo a la lateralidad. En este capítulo, se ha querido mostrar las implicaciones y el efecto que tiene esta asimetría, basándose en la compensación ovulatoria por modificación hormonal y la influencia del ambiente uterino sobre la proporción de sexos secundaria, en fetos de ratonas de cepas consanguíneas y no consanguíneas. Además nos permite analizar cómo la competencia embrionaria que se produce en un cuerno uterino de la hembra hemiovariectomizada, afecta el tamaño de camada y a la proporción de sexos.

En el primer experimento analizamos el efecto que causan las ovariectomías unilaterales, tanto derecha como izquierda, en hembras de ratón de cepas no consanguíneas. Asimismo, estudiamos su influencia en la proporción de sexos, así como la relación de lateralidad y posicionamiento según el sexo de los fetos en el útero. En el segundo experimento se utilizarán hembras ovariectomizadas de la cepa consanguínea B6, cuyas crías son genéticamente idénticas (por lo que las diferencias fenotípicas serán de origen ambiental y/o epigenético), para estudiar el efecto de la compensación ovocitaria/uterina del lado no ovariectomizado, y cómo podría modificar la proporción del sexo, el peso fetal y su distribución embrionaria en el útero.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Animales**

Se utilizaron ratonas CD1 (no consanguíneas) y B6 (C57BL/6J) consanguíneas para realizar las ovariectomías unilaterales. Asimismo se utilizaron machos tanto transgénicos pCAGGS-EGFP (CX-EGFP, CX-38 Chr X D), obtenidos del repositorio RIKEN BioResource Center, Japan, descrito previamente en (Nakanishi et al., 2002), portadores de una marca fluorescente en el cromosoma “X” (X-EGFP) de fondo genético B6C3F1, y también utilizaremos machos de la cepa B6 consanguíneos. Los animales fueron mantenidos con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, a una temperatura de 23°C y humedad relativa de 60%.

### **2.2. Ovariectomía unilateral en ratonas CD1 y B6**

Una semana previa al cruce se realizó la ovariectomía unilateral. Para ello 55 hembras CD1 (12-15 semanas de edad) fueron sometidas a cirugía para extirpar un ovario y así obtener ratonas hemi-ovariectomizadas o bien del lado derecho (grupo con sólo la presencia del ovario izquierdo, OVX-D) o bien del lado izquierdo (grupo con sólo la presencia del ovario derecho, OVX-I). Las ratonas se anestesiaron inhalatoriamente empleando isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter), con control de oxígeno y temperatura en un ambiente estéril. La ovariectomía se realizó mediante cirugía y con previa sutura de vasos sanguíneos involucrados, evitando dañar el oviducto o cualquier otra estructura adyacente. Después de la operación se inyectó buprenorfina 0,1 mg/Kg por vía intraperitoneal (Laboratorios Schering-Plough, España). Al cabo de una semana de recuperación, se realizaron cruces de monta natural (sin superovulación) con machos X-EGFP y se mantuvo el desarrollo fetal hasta el día 12 de gestación, anotándose en ese momento la cantidad de fetos, el sexo y la posición uterina.

En el caso de las ratonas B6 consanguíneas, se las realizó una ovariectomía unilateral izquierda y después de una semana de la cirugía se cruzaron con machos B6.

Luego de determinarse la presencia del tapón vaginal, se esperó 16 días para su sacrificio. A continuación, se determinó el sexo mediante el reconocimiento anatómico de estructuras primigenias de testículos y ovarios (anillos germinales). Asimismo, se realizaron disecciones, y se registraron tanto el peso como la posición de cada sexo que ocupan dentro del útero.

### **3. Análisis estadístico**

Para todas las proporciones secundarias de los sexos globales, parciales y por secciones uterinas, se realizó una prueba de Chi-cuadrado con bondad de ajuste. Además en los casos de tamaños de camada y pesos fetales, se empleó un análisis de varianza de una vía. Todos los intervalos de confianza por encima del 95% fueron tomados como diferencias significativas. En las comparaciones estadísticas se utilizó el programa SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc).

## 4. Resultados

### 4.1. Efecto de la ovariectomía unilateral en ratonas CD1 sobre la proporción de sexos y distribución de los fetos en el cuerno uterino

Los resultados de la Tabla 1 muestran las proporciones de sexos de los fetos en día 12 en cada cuerno uterino de ratonas CD1 ovariectomizadas unilateralmente y cruzadas mediante monta natural, con ratones transgénicos X-EGFP una semana después de la operación. No se observó diferencias entre los grupos de ovariectomía unilateral derecha (OVX-D, presencia de ovario izquierdo) y ovariectomía unilateral izquierda (OVX-I, presencia de ovario derecho) comparado con la proporción de sexos de los controles totales, y de cuernos uterinos derechos e izquierdos de ratonas CD1 tomados de forma independiente. Tampoco se observaron diferencias en los pesos de los ovarios de hembras OVX-I o OVX-D.

**Tabla 1. Proporción del sexo secundario en ratonas CD1 ovariectomizadas unilateralmente**

	N° fetos			Proporción de sexos totales		Proporción de sexo cuerno uterino derecho		Proporción de sexo cuerno uterino izquierdo	
	Total	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
<b>Control</b>	394	191	203	48,0	52,0	48,0	52,0	48,0	52,0
<b>OVX-D</b>	286	134	152					47,0	53,0
<b>OVX-I</b>	337	180	157			53,0	47,0		

OVX-D= hemi-ovariectomía derecha, OVX-I= hemi-ovariectomía izquierda.

En cuanto al tamaño de camada, las ratonas ovariectomizadas tuvieron una tendencia a compensar la pérdida de fetos a implantar por camada que se produce al retirarse quirúrgicamente uno de los ovarios. De ahí que obtuvimos diferencias de tamaños de camada por cada cuerno uterino de las ratonas ovariectomizadas comparadas con los cuernos uterinos tomados de forma independiente de los controles de ratonas CD1. Además no se encontraron diferencias entre los tamaños de camada entre los grupos OVX-I y OVX-D. (Tabla 2). En cuanto al número de fetos totales por hembra, se observa una ligera disminución en los animales ovariectomizados.

**Tabla 2. Promedio de fetos implantados en los cuernos uterinos en ratonas CD1 después de realizar una ovariectomía unilateral**

Tamaños de camada					
Cepa CD1		n	Macho	Hembra	Total
Control	Cuerno uterino derecho	27	3,26±0,34 <sup>a</sup>	3,37±0,35 <sup>a</sup>	13,13±0,65 <sup>a</sup>
	Cuerno uterino izquierdo	27	3,10±0,32 <sup>a</sup>	3,41±0,29 <sup>a</sup>	
OVX-D		26	5,15±0,44 <sup>b</sup>	5,85±0,39 <sup>b</sup>	11,00±0,49 <sup>b</sup>
OVX-I		29	6,21±0,51 <sup>b</sup>	5,41±0,40 <sup>b</sup>	11,62±0,56 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas, P<0,05. n=número de camadas.

#### 4.2. Ubicación de machos y hembras en el cuerno uterino de ratonas CD1 hemiovariectomizadas

Además de registrar el sexo de los embriones en cada cuerno uterino, se anotó la posición que ocupaban dichos embriones dentro del útero con el fin de observar si existía algún patrón de implantación de acuerdo al sexo. Para ello, se dividió cada cuerno uterino derecho e izquierdo en 4 partes iguales: dos extremos y dos partes intermedias, y se dividió los tamaños de camada entre estas secciones de manera

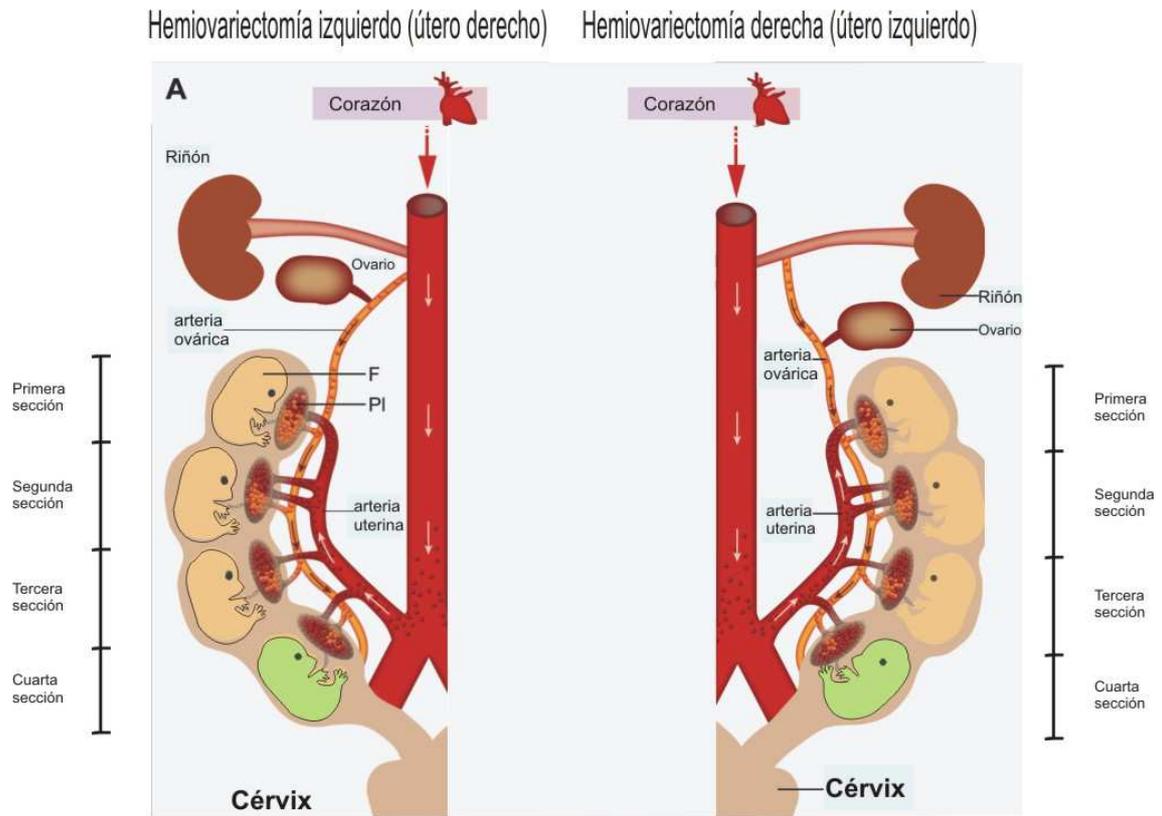
proporcional. Se consideró la primera sección como la que se encontraba más cercana al ovario remanente y la cuarta la sección fue la que se encontraba más próxima al cérvix. En la ovariectomía unilateral izquierda, OVX-I (útero derecho), las tres regiones más cercanas al ovario mostraron un ligero aumento en la proporción de machos, pero tanto las secciones consideradas individualmente, como las agrupaciones de secciones no mostraron diferencias significativas en la proporción de sexos. (Tabla 3). Sólo cuando se considera conjuntamente la comparación entre las tres primeras secciones con la cuarta (aplicando la suma de las tres chi-cuadrado) se observa que la sección más cercana al cérvix presenta mayor proporción de hembras que el resto de las tres secciones (Figura 2).

En las hembras con ovariectomía unilateral derecha, OVX-D (útero izquierdo), la proporción de sexos por secciones era más irregular que en las hembras con ovariectomía izquierda. La proporción de machos en la primera sección se mostró ligeramente superior y menor en la segunda y cuarta, aunque sólo esta última tuvo diferencias significativa a favor de las hembras ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4). Cuando se agrupan las secciones, ninguna de las mitades muestra una clara diferencia en la distorsión de la proporción 50:50.

**Tabla 3. Proporción del sexo de los fetos distribuidos en 4 secciones del cuerno uterino derecho de hembras CD1hemi-ovariectomizadasOVX-I**

	Divisiones del útero derecho (OVX-I), n (%)					
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Primera+ segunda	Tercera+ cuarta
<b>Machos</b>	46,5 (57,40)	45,5 (54,00)	48,25 (57,27)	40 (47,50)	92 (55,7)	88.25 (52,27)
<b>Hembras</b>	34,5 (42,60)	38,75 (46,00)	36 (42,73)	44,25 (52,50)	73.25 (44,3)	80.25 (47,65)

Primera sección= próxima a oviducto; cuarta sección=próxima a cérvix. OVX-I= ovariectomía izquierda, n=número de fetos, %=porcentaje. <sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas, P<0,05.



**Figura 2:** Esquema mostrando las diferencias de riego sanguíneo de arterias ováricas y uterinas a los fetos implantados, en ratas hemiovariectomizadas del lado derecho e izquierdo. En cada placenta se indica en amarillo el aporte de las arterias ováricas (amarillo) y uterinas (rojo). A los lados se muestra esquemáticamente las 4 secciones uterinas (feto verde=hembra). Figura modificada de (Raz et al. 2012)

**Tabla 4. Proporción del sexo de los fetos distribuidos en 4 secciones del cuerno uterino izquierdo de hembras CD1 hemi-ovariectomizadas OVX-D**

	Divisiones del útero izquierdo (OVX-D), n (%)					
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Primera+ segunda	Tercera+ cuarta
<b>Machos</b>	40,00 (56,00)	29,00 (40,00)	38,00 (53,00)	27,00 (38,00) <sup>a</sup>	69,00 (48,42)	65,00 (45,61)
<b>Hembras</b>	31,25 (44,00)	42,25 (60,00)	33,25 (47,00)	44,25 (62,00) <sup>a</sup>	73,50 (51,58)	77,50 (54,39)

Primera sección= próxima a oviducto; cuarta sección= próxima a cérvix. OVX-D= ovariectomía derecha, n=número de fetos, %=porcentaje. <sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas,  $P<0,05$ .

En OVX-I, se observó que en el útero derecho, el rango de lugares de implantación va desde 4 hasta 18, siendo el número de implantaciones que más se repite de 12 fetos por camada. Estas se encuentran en 8 de 29 ratonas preñadas (28%), y de estas 8 ratonas, 5 tienen mayor porcentaje de machos por ratona, por encima del 50%, y 2 de ellas con menor proporción de machos (33%) (Tabla5). Entre las ratonas con más de 12 implantaciones, también había un mayor número de hembras con mayor proporción de machos, 5 tenían más de 50% de machos y 3 menos de esa proporción.

En OVX-D el rango de implantación encontrado fue de 4 a 14 fetos por ratona. El número de implantaciones que más se repite es de 13 fetos por camada, y se encontraron en 8 de las 26 ratonas preñadas. De estas 8, solo 3 tenían una alta proporción del sexo por encima de 50%, y en 5 de ellas se obtuvo un ligero aumento de la proporción de las hembras. En este grupo, sólo una ratona tuvo una proporción de machos del 23% (3 machos: 10 hembras) (Tabla 5). Sólo una ratona tuvo más de 13 implantaciones, mientras que en el grupo de OVX-I hubo 7 de 29 que tuvieron más de

13 implantaciones. Se observó un menor número medio ligeramente inferior de implantaciones en el grupo de ovariectomía derecha que la izquierda, aunque las diferencias no eran significativas. Tampoco hubo diferencias en la proporción de machos globales.

**Tabla 5. Proporción secundaria de sexos por tamaño de camada en hembras CD1 hemi-ovariectomizadas OVX-I y OVX-D**

N° de camadas	OVX-I (cuerno uterino derecho)			OVX-D (cuerno uterino izquierdo)		
	N° de sitios de implantación por hembra	Razón	Proporción de machos (%)	N° de sitios de implantación por hembra	Razón	Proporción de machos (%)
		M:H			M:H	
1	18	10:08	56,0	14	05:09	36,0
2	17	14:03	82,0	13	09:04	69,0
3	15	08:07	53,0	13	09:04	69,0
4	15	05:10	33,0	13	07:06	54,0
5	14	08:06	57,0	13	06:07	46,0
6	14	07:07	50,0	13	06:07	46,0
7	14	06:08	43,0	13	06:07	46,0
8	13	09:04	69,0	13	06:07	46,0
9	13	05:08	38,0	13	03:10	23,0
10	12	10:02	83,0	12	07:05	58,0
11	12	09:03	75,0	12	07:05	58,0
12	12	08:04	67,0	12	07:05	58,0
13	12	08:04	67,0	12	03:09	25,0
14	12	07:05	58,0	11	08:03	73,0
15	12	06:06	50,0	11	07:04	64,0
16	12	04:08	33,0	11	05:06	45,0
17	12	04:08	33,0	11	04:07	36,0
18	11	07:04	64,0	11	03:08	27,0
19	11	06:05	55,0	11	03:08	27,0
20	11	04:07	36,0	10	04:06	40,0
21	11	03:08	27,0	9	05:04	56,0
22	10	07:03	70,0	9	04:05	44,0
23	10	05:05	50,0	8	05:03	63,0
24	9	05:04	56,0	8	02:06	25,0
25	9	04:05	44,0	5	02:03	40,0
26	9	03:06	33,0	4	01:03	25,0
27	8	04:04	50,0			
28	5	02:03	40,0			
29	4	02:02	50,0			
<b>Media</b>	11,62±3,02		53	10,96±2,50		47

M:H = machos:hembras.

### 4.3. Ovariectomía unilateral izquierda en la cepa consanguínea B6

Una semana después de haber realizado la hemi-ovariectomía izquierda a 39 hembras de cepas consanguíneas B6, y de cruzarlas (sin superovulación) con machos B6, se registró la distribución de sexos y pesos fetales en día 16 según la posición en la que se encontraban en el útero. La proporción secundaria del sexo encontrada fue de 47,79% de machos y 52,21% de hembras. El tamaño de camada fue de  $6,38 \pm 0,26$  crías. De forma similar al experimento anterior se dividió al útero de 13 ratonas en 4 secciones donde la primera sección es la que se encuentra más cercana al ovario remanente. Cuando se organizaron de acuerdo a estas 4 secciones, no se encontraron diferencias significativas en el promedio de los pesos de cada sexo de las tres primeras secciones empezando desde el ovario intacto (Figura 3). Sin embargo, en la porción más cercana al cérvix, el peso de las crías hembras a día 16 eran inferiores a las otras secciones y presentaba un menor peso significativo al de los machos (Tabla 6). Al considerar los datos de la proporción de sexos de forma global, no se observó alterada la proporción de sexos. Sin embargo, la cuarta sección empezando desde el extremo más cercano al ovario, se observó un alto número de implantaciones de embriones hembras (Tabla 7), y cuando agrupábamos secciones la agrupación de la tercera y la cuarta también contenía mayor proporción de hembras (Tabla 7).

**Tabla 6. Peso de fetos en día 16 de gestación en relación con la posición fetal intrauterina, de cruces naturales de hembras B6 hemi-ovariectomizadas (OVX-I) con machos B6**

	<b>Divisiones del útero derecho (OVX-I)</b>			
<b>Peso(g)</b>	<b>Primera</b>	<b>Segunda</b>	<b>Tercera</b>	<b>Cuarta</b>
<b>Machos</b>	0,629 <sup>a</sup>	0,639 <sup>a</sup>	0,631 <sup>a</sup>	0,643 <sup>a</sup>
<b>Hembras</b>	0,625 <sup>a</sup>	0,642 <sup>a</sup>	0,633 <sup>a</sup>	0,562 <sup>b</sup>

Primera sección= próxima a oviducto; cuarta sección= próxima a cérvix.

<sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas,  $P < 0,05$ .

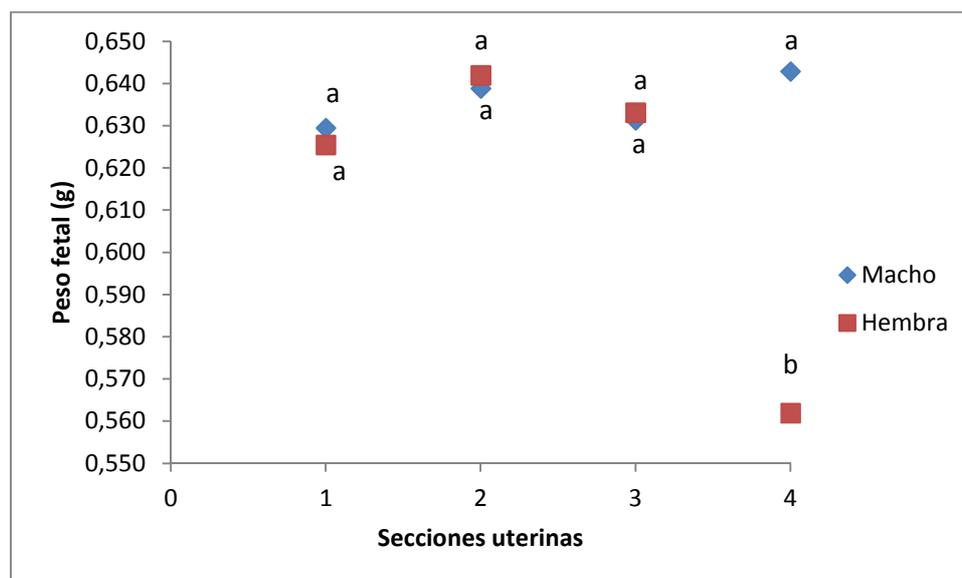


Figura 3. Peso de fetos en día 16 de gestación en relación con la posición fetal intrauterina, de cruces naturales de hembras B6 hemi-ovariectomizadas con machos B6. <sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas, P<0,05.

Tabla 7. Proporción secundaria de sexos de fetos de día 16, de acuerdo a las divisiones uterinas en ratonas B6 hemi-ovariectomizadas (OVX-I)

	Secciones uterinas, n (%)					
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Primera+ segunda	Tercera+ cuarta
<b>Machos</b>	41,00 (53,25)	29,00 (50,00)	36,00 (51,43)	21,00 (32,81) <sup>a</sup>	70,00 (51,85)	57,00 (42,54) <sup>a</sup>
<b>Hembras</b>	36,00 (46,75)	29,00 (50,00)	34,00(4 8,57)	43,00 (67,19) <sup>b</sup>	65,00 (48,15)	77,00 (57,46) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Muestran diferencias significativas de la proporción 50:50, P<0,05.

También se trató de establecer si la cercanía de uno, dos o la ausencia de embriones machos o hembras adyacentes a un feto modificaba los patrones en el peso fetal, debido a la influencia hormonal y nutricional del hermano adyacente. Sin embargo, en estos estadios de desarrollo no se encontró ninguna relación de estos parámetros (Tabla 8).

**Tabla 8. Peso de fetos en día 16 respecto al sexo que le rodea, provenientes de cruces de monta natural de ratonas consanguíneas B6 (OVX-I) con machos B6**

Estado fetal, dependiente del hermano adyacente			
Efecto del hermano macho en el feto hembra	Peso del feto D16 (g)	Efecto del hermano macho en el feto macho	Peso del feto D16 (g)
0M	0,634±0,05	0M	0,627±0,05
1M	0,549±0,05	1M	0,675±0,08
2M	0,651±0,01	2M	0,575±0,12
Efecto de la hermana hembra en el feto macho		Efecto de la hermana hembra en el feto hembra	
0H	0,563±0,05	0M	0,678±0,05
1H	0,652±0,05	1M	0,566±0,03
2H	0,614±0,05	2M	0,639±0,03

0M: ningún hermano macho adyacente, 1M: un hermano macho adyacente, 2M: entre dos hermanos machos, 0H: sin hermanas adyacentes, 1H: una hermana adyacente, 2H: entre dos hermanas.

## 5. Discusión.

El presente capítulo analiza las posibles diferencias en la proporción secundaria de los sexos que se pueden originar por las diferencias entre ovarios y úteros derechos e izquierdos en hembras ovariectomizadas. Algunos estudios realizados utilizando fecundaciones *in vitro* (FIV) han mostrado una respuesta diferencial de ambos ovarios y cuernos uterinos y cómo esta respuesta puede tener alguna influencia sobre la proporción de sexos primaria y secundaria (Wiebold y Becker 1987). Además, se ha publicado que el ovario derecho ovula con mayor frecuencia y cantidad que el izquierdo (Fukuda et al. 2000), y que existen diferencias bilaterales para el desarrollo embrionario en el medio ambiente uterino. Nuestros resultados confirman que después de una hemi-ovariectomía en ratón, se produce una compensación fisiológica debido a la hipertrofia del ovario y como consecuencia no se reduce a la mitad el tamaño de camada en comparación con las ratonas con ambos ovarios (Hollander 1950, McLaren 1963, Pepler 1971, Baker et al. 1980, Burden et al. 1986). No hemos encontrado diferencias entre el tamaño de camadas de los grupos ovariectomizados OVX-D y OVX-I, pero se han encontrado camadas más grandes en el grupo de OVX-I, indicando mayor capacidad del útero derecho o mayor capacidad de ovular del ovario derecho.

En relación a la proporción de sexos, aunque otros autores en bovino (Hylan et al. 2009) y en roedores (Vickers 1969, Clark y Galef 1990, Clark et al. 1994) han publicado que el ovario derecho produce más machos que hembras, nosotros hemos observado que cuando utilizamos la cepa de ratones CD1 no consanguínea o la cepa B6 consanguínea, no encontramos diferencia entre el porcentaje total de sexos en el cuerno uterino derecho ni izquierdo, causados por la ovariectomía unilateral.

En cuanto a la posición de los fetos en el cuerno uterino, los resultados muestran cierta tendencia de ubicación uterina dependiente del sexo. Al dividir cada útero en 4 partes, siendo la primera más cercana al ovario y la última más cercana al cérvix, se observa en ratonas B6 con OVX-I un aumento de implantaciones hembras en el segmento más cercano al cérvix. Esto indica que el extremo uterino más cercano al cérvix es la región más susceptible de encontrar variaciones en la proporción de sexos de los fetos implantados en las ratonas hemi-ovariectomizadas. Hay que indicar que los

extremos del útero reciben menor riego sanguíneo, siendo el extremo más cercano al cérvix el que recibe menor riego de la aorta ovárica, siendo en principio peor lugar para implantar, de forma que solo los embriones más retrasados en desarrollo encuentran disponible esta posición. Como las hembras durante el desarrollo pre-implantacional generalmente se desarrollan más lentamente, seleccionarían el lugar de implantación después que el de los machos, esto explicaría porque el extremo final del útero izquierdo tiene mayor proporción de hembras. Este efecto también se observa, aunque en menor medida en las hembras CD1, probablemente por su mejor condición corporal no existan tan claras diferencias entre las distintas regiones del útero.

Por otro lado, el número de fetos implantados que más se repite en las camadas es de 12 en el útero derecho y 13 en el izquierdo. Esto muestra un número promedio de implantaciones similar a lo que se obtendría de forma natural. Lo que indica que la compensación ovulatoria y gestacional está ocurriendo de forma efectiva en estas camadas. Cuando analizamos la proporción de machos por camada, observamos que en el útero derecho de las hembras OVX-I nos encontramos con 19 de 29 camadas donde hay más del 50% de machos, mientras en el útero izquierdo de las hembras OVX-D hay solo 10 de 26 camadas tienen más del 50% de machos. Aunque las diferencias totales no son significativas, los resultados concuerdan con la hipótesis que el cuerno derecho con distinto riego sanguíneo puede albergar mayor proporción de machos. En la misma tendencia se observa que la media de fetos en el útero derecho es 11,6 frente a 10,9 en el izquierdo.

Los resultados obtenidos con las hemi-ovariectomias (OVX-I) de la línea consanguínea B6 nos permiten descartar en nuestros análisis, el factor genético como fuente de variación entre camadas. Los animales son de la misma edad y crecidos en el mismo ambiente, y son genéticamente idénticos, por lo que las diferencias entre individuos deberán tener un origen que no sea genético ni mediado por la parte ambiental común controlada. En cuanto a la proporción total de sexos de las crías de cepas consanguíneas B6 ovariectomizadas unilateralmente tampoco se observó una desviación de la proporción esperada 50:50. Sin embargo, se observó una mayor implantación de embriones hembra en la cuarta división del útero, la más cercana al cérvix. También se observó en esta sección más cercana al cérvix que los pesos en las hembras era menor que el peso de hembras y machos en las otras secciones. Estos

hechos nos permiten pensar que como los embriones con desarrollo más lento son hembras, estos embriones se implantan en las peores zonas que el resto de embriones dejan disponibles, de tal forma que las partes más alejadas del ovario, las cuales tienen peor flujo sanguíneo, son las únicas disponibles para la implantación de los embriones de desarrollo más lento, que corresponderían a las hembras de peor calidad. Este menor peso al nacer de los primeros animales que paren aportaría una ventaja adaptativa para favorecer el parto.

En nuestro estudio, no parece haber influencia en la ganancia o pérdida de peso por la presencia o ausencia de un feto del mismo sexo o del sexo contrario adyacente. Otros autores han publicado en hembras de cerdo que el sexo de los fetos hermanos no afecta los niveles de testosterona y estrógenos. Sólo las concentraciones de thymosin  $\beta$ 4 han sido bajas en hembras rodeadas de dos machos, pero esta concentración no se modifica cuando hay un macho entre dos hembras (Wise y Christenson 1992). Algunos autores han mostrado en cerdos, ratones y humanos, que la presencia o ausencia de hembras hermanas adyacentes a una hembra ejerce un efecto, ya sea por las concentraciones de estradiol (2H) o de testosterona (0H) (Vom Saal 1999). Sin embargo es posible que la variabilidad genética de embriones híbridos no consanguíneos, tenga un efecto sobre estas condiciones, que en cepas consanguíneas no se aprecien. Por otra parte, las diferencias pueden que no sean visibles al día 16 de desarrollo en el que realizamos nuestras observaciones.

Nuestros datos corroboran los resultados obtenidos previamente de compensación ovulatoria por hemi-ovariectomía (Hollander 1950, McLaren 1963, Peppler 1971, Baker et al. 1980, Burden et al. 1986), demostrando que no existe una relación directa entre la ovariectomía del ovario derecho o izquierdo y la proporción de sexo del total de fetos implantados. Sin embargo, en las hembras hemi-ovariectomizadas se observa un aumento de la proporción de fetos hembra en la sección uterina más cercana al cervix, y en la cepa consanguínea B6 se observa una clara disminución del peso de las hembras implantadas en la región más cercana al cervix, posiblemente indicando que esta región de menor riego sanguíneo es la última región disponible para la implantación de los embriones que llegan más tarde al útero, que correspondería con los embriones hembra de división más lenta.

# Capítulo IV

**Calidad embrionaria en función de la velocidad de desarrollo pre-implantacional y proporción de sexos**



## INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo pre-implantacional, los embriones de distinto sexo presentan un dimorfismo sexual causado por sus diferencias cromosómicas que hace que en función de su sexo muestren características moleculares distintas (como inactivación del cromosoma X, expresión genética, funciones metabólicas y cambios epigenéticos) (Bermejo-Alvarez et al. 2011), y manifiesten además distintas características fenotípicas, como por ejemplo, diferencias en su velocidad de desarrollo (Avery et al. 1992, Peippo y Bredbacka 1995) y en su número celular (Burgoyne 1993). Muchas publicaciones muestran que los embriones macho se desarrollan más rápido que los embriones hembra en bovinos (Avery 1989, Xu et al. 1992, Yadav et al. 1993), murinos (Valdivia et al. 1993, Peippo y Bredbacka 1995), ovinos (Bernardi y Delouis 1996, Catt 1997), porcinos (Cassar et al. 1994, Cassar et al. 1995) y humanos (Pergament et al. 1994). Sin embargo, otros estudios en humanos (Munne et al. 1993, Ng et al. 1995), bovinos (Holm et al. 1998) y porcinos (Kaminski et al. 1996) no han reportado este fenómeno. Además, esta diferencia en la velocidad de división es mucho más evidente en los embriones producidos *in vitro* (Avery, 1989; Avery et al. 1991; Xu et al. 1992; Carvalho et al. 1996) aunque también se ha encontrado en embriones obtenidos *in vivo* (Avery et al. 1992). Se ha observado, que cuando embriones bovinos producidos *in vitro* se agrupan en rápidos y lentos de acuerdo a su velocidad de crecimiento, a las 192 horas post inseminación, se produce una distorsión del sexo hacia blastocistos macho, proponiendo que después de la primera división embrionaria, existen factores dependientes del sexo que intervienen en el desarrollo embrionario (Lonergan et al. 1999, Kochhar et al. 2003). En la clínica humana, cuando se seleccionaban los embriones para transferir de acuerdo a la rapidez de alcanzar el estadio de blastocisto, se obtuvieron un mayor número de nacimientos de hombres que mujeres, debido a una selección de embriones macho que mostraban un desarrollo más rápido (Pergament et al. 1994, Tarin et al. 1995).

La utilización de medios de cultivo *in vitro*, además de alterar la velocidad de crecimiento, pueden influir en la supervivencia de los embriones, modificando incluso la proporción primaria de los sexos (Thatcher et al. 1989). Por ejemplo se observó que

los embriones bovinos cultivados en medio KSOM-SOF durante 156 horas de cultivo que eclosionan, daban lugar predominantemente a machos (Nedambale et al. 2004). También se ha evidenciado que otros medios de cultivo sub-óptimos como el CR1aa sin glucosa, también podrían afectar a la proporción de sexos (Bredbacka y Bredbacka 1996). Por otra parte se ha descrito que la utilización de medios de cultivo con altos contenidos de glucosa generaba una mayor cantidad de embriones bovinos de sexo masculino (Avery et al. 1992, Gutierrez-Adan et al. 2001). Sin embargo, otros autores indican que sus resultados, al menos en ratón, no son concluyentes en relación a la alta concentración de glucosa en el medio de cultivo y su papel en la distorsión de la proporción del sexo (Bermejo-Alvarez et al. 2012).

Para mejorar los sistemas de cultivo *in vitro*, se utilizan métodos de co-cultivo que intentan reproducir lo que ocurre *in vivo*, adecuando los medios y sistemas para su uso en el laboratorio. Cuando se realizan co-cultivos de embriones bovinos con células epiteliales de riñón (células Vero) y con células epiteliales del oviducto bovino (BOEC) se ha descrito una influencia positiva en el aumento del número de células en el estadio de blastocistos (Pegoraro et al. 1998). Además en ambos co-cultivos se observó un aumento de la proporción de machos (Pegoraro et al. 1998); estos resultados no fueron observados en otro estudio cuando los embriones fueron cultivados en medios condicionados con células del oviducto y libres de suero hasta el sexto y séptimo día de desarrollo pre-implantacional (Grisart et al. 1995). Tampoco se observaron diferencias en relación a la proporción del sexo cuando se compararon dos medios de cultivo como el SOF y TCM 199 con suero, complementados ambos con un co-cultivo de células oviductales (Larson et al. 2001). Actualmente el medio más utilizado para el cultivo de embriones de ratón, es el medio optimizado simple de potasio (KSOM), el cual se ha descrito que no altera la expresión global de genes en el blastocisto cuando se compara su expresión con embriones producidos *in vivo* (Summers 2013).

La diferencia en velocidades del desarrollo también ha sido utilizada para predecir la calidad de un blastocisto a la hora de implantar (Edwards et al. 1984). En algunas clínicas humanas es un criterio que ha conseguido mejoras en sus tasas de implantación (Kaser y Racowsky 2014). Actualmente, con las técnicas de análisis de imágenes en lapsos de tiempo (ILT), se ha podido predecir con alta fiabilidad el

desarrollo a estadio de blastocisto antes de la activación del genoma materno-embriionario humano (EGA) (Wong et al. 2010), reduciendo de esta forma el periodo de cultivo *in vitro*. Sin embargo la selección por ILT continúa siendo un método experimental y no existe ningún parámetro morfocinético que de forma consistente prediga el potencial de implantación de un embrión (Kaser y Racowsky 2014). Recientemente se ha observado que los embriones con mayores y menores velocidades de división *in vitro* tienen más alteraciones en su regulación epigenética y más anomalías cromosómicas en los embriones con una velocidad de desarrollo intermedia (Magli et al. 1998). Debido a ello se ha propuesto no realizar transferencias de embriones con una velocidad de desarrollo excesiva, ya que muchas veces estos embriones contienen anomalías cromosómicas y epigenéticas que dan lugar a tasas de preñez muy bajas (Gutierrez-Adan et al. 2014). En relación a los embriones que se desarrollan más lento, se ha propuesto en porcino, que los embriones con desarrollo más lento sobreviven peor *in vivo* (Cassar et al. 1994), posiblemente porque esa diferencia en velocidades de desarrollo pre-implantacional posteriormente refleje el lugar de implantación intrauterino, siendo los más lentos los que tiene los peores lugares de implantación y por lo tanto peor tasa de supervivencia fetal.

En este capítulo, nuestro objetivo se centra en analizar si existe una relación entre la velocidad de desarrollo a 3 células, justo después de la activación genómica embrionaria, y la posterior velocidad de desarrollo a blastocisto, con la proporción primaria de sexos y la calidad del blastocisto cuantificada en niveles de expresión génica. Para todos los experimentos se consideraron por separados los embriones obtenidos del ovario derecho y del izquierdo.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Animales, tratamiento de superovulación y cultivo de embriones

Se han utilizado hembras B6C3F1 (C57BL/6J x CBA). La inducción de superovulación se realizó por inyección intraperitoneal de 7,5 unidades internacionales (UI) de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG Folligon 500, Intervet) seguida 48 horas después de 7,5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Veterin Corion Equinvest). Para la determinación de la proporción del sexo las hembras se cruzaron con machos reproductores de la cepa B6C3F1 con el transgen  $X^{GFP}$  (pCAGGS-EGFP, CX-EGFP, CX-38 Chr X D) (Nakanishi et al., 2002). Este transgénico se empleó para distinguir en los estadios de blastocisto y mórula, los machos y las hembras (Anexo 1). Estos ratones transgénicos fueron obtenidos del repositorio (RIKEN BioResource Center, Japan). Los embriones se cultivaron en un medio optimizado con potasio suplementado con aminoácidos (KSOM, Specialty Media, Milipore, España) en condiciones de atmósfera húmeda y con un 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en aire a 37°C.

### 2.2. Obtención de embriones y clasificación según su velocidad de desarrollo

A las 42 horas post hCG se recuperaron los embriones en estadio de dos a tres células mediante lavados a través del oviducto, obteniendo un 20-30% del total de embriones en estadio de 3 células, este grupo se denominó de división más rápida “R”. Los restantes embriones se clasificaron en dos grupos; un grupo que a las 45-50 horas post hCG había completado su división a 3 células, grupo que se denominó de velocidad de desarrollo intermedia “M”; y el resto de embriones, con divisiones posteriores a las 50 horas post hCG, fueron considerados como embriones de desarrollo más lento “L”. Finalmente, los tres grupos de embriones se dejan desarrollar hasta el estadio de blastocistos, para la determinación primaria del sexo y se clasificaron nuevamente por su velocidad de desarrollo como blastocistos tempranos, blastocistos y blastocistos expandidos de acuerdo la clasificación del Manual IETS (Stringfellow y Givens 1990).

---

De forma que a los embriones que el día 3,5 estaban en estadio de blastocisto tempranos y blastocistos (tB+B) se les calificó como “Lentos” y a los que estaban en estadio de blastocistos expandidos (exB) se les calificó como “Rápidos”, generándose 6 diferentes grupos en función de la velocidad de desarrollo (de 2 a 3 células y de 3 células a blastocisto): “Rápido/Rápido” (RR), “Rápido/Lento” (RL), “Medio/Rápido” (MR), “Medio/Lento” (ML), “Lento/Rápido” (LR) y “Lento/Lento” (LL).

### **2.3. Aislamiento de ARN, síntesis de ADN copia y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).**

Se realizaron 4 repeticiones experimentales para analizar los 6 grupos de blastocistos clasificados de acuerdo a la velocidad de división como se indicó en el apartado anterior. El ARN fue extraído agrupando 10 blastocistos de cada muestra de los grupos usando el *RNeasy Micro Kit (Qiagen)* (Bermejo-Alvarez et al. 2011). Después de la extracción se llevó a cabo la retrotranscripción; brevemente, en el termociclador, los tubos fueron calentados a 70°C por 5 minutos hasta desnaturalizar la estructura secundaria del ARN, permitiendo el alineamiento de pequeñas secuencias del cebador al azar (*random primer*) y oligonucleótidos con colas de timina (oligo-dT). La mezcla de retrotranscripción fue completada con la adición de 5 unidades del enzima *Superscript RT*. A continuación, los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por 10 minutos y luego a 42°C por 60 minutos, permitiendo la transcripción inversa del ARN, sometiendo posteriormente la muestra a temperaturas de 70°C por 10 minutos para desnaturalizar e inactivar el enzima de retrotranscripción. Para la detección de cada transcrito, se usaron 2 µl de DNA copia y se cuantificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) usando el kit comercial GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Las secuencias de cebadores están detalladas en el Anexo 6.

Los experimentos fueron diseñados comparando los niveles relativos de cada transcrito, al del gen de expresión ubicua de Histona H2az en cada muestra. El método utilizado para medir los niveles de expresión fue del ciclo comparativo de *threshold* (CT) (Bermejo-Alvarez et al. 2010). La cuantificación fue normalizada con controles

endógenos H2az. Para determinar el ciclo de *threshold* (momento de cuantificación), la fluorescencia fue adquirida en cada ciclo, seleccionando el ciclo en la fase linear-logarítmica de la reacción mientras la fluorescencia incrementa en cada muestra. Dentro de esta región de curva de amplificación, una diferencia de un ciclo es equivalente al doble de producto de PCR amplificado. De acuerdo al método de CT comparativo, el valor de CT fue determinado sustrayendo el valor de CT de H2az de cada muestra, al valor de CT de cada gen por muestra analizada. El valor de CT fue calculado usando el valor de CT de la muestra más alta (es decir, la muestra con más baja expresión del gen amplificado) como una constante arbitraria para ser sustraída de todos los otros valores de CT. El cambio en la expresión relativa del gen fue determinado mediante la fórmula  $2^{-CT}$ .

### 3. Análisis Estadístico.

El procesamiento de los datos fue realizado mediante el programa Sigma Stat (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Para comparar los porcentajes de proporción de sexo se usó una prueba de Chi-cuadrado con bondad de ajuste. Para los porcentajes de desarrollo, y transcripción de genes entre los grupos de estudio se realizó un análisis de varianza de una vía (*one way ANOVA*) y la significación fue determinada por una prueba Holm-Sidak post hoc. Fue necesario realizar la conversión de porcentajes y proporciones a arcoseno para normalizar los datos. Un valor de confianza mayor del 95% se consideró estadísticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efecto de la velocidad de la segunda división embrionaria y la proporción primaria del sexo

Los embriones se recuperaron a las 48 horas después de la inyección de hCG, en el paso de 2 a 3 células. Como se muestra en la Tabla 1, se recuperaron más embriones fecundados en el oviducto derecho. Asimismo, el total de fecundados más no fecundados y fragmentados era también mayor en el oviducto derecho, indicando una mayor ovulación de este ovario. Los embriones se agruparon en rápidos, medios y lentos como se describe en Material y Métodos. Una vez alcanzado el estadio de blastocisto se determinó el sexo mediante la visualización de la emisión de fluorescencia por parte de los embriones hembra (Anexo 1). No se observaron diferencias significativas en la proporción primaria de sexos en estos grupos, aunque existe una proporción de machos mayor en el grupo de rápidos, que en el resto de grupos (Tabla 2).

**Tabla 1. Porcentajes de ovulación en los grupos de embriones separados según su segunda división embrionaria**

Oviducto	Embriones recuperados n,(%)	Fragmentado o no fecundado n, (%)	Total n, (%)
Izquierdo	336 (45,84)*	41 (10,87)	377 (45,64)*
Derecho	397 (54,16)*	52 (11,58)	449 (54,36)*
<b>Total</b>	733	93	826

\* indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ . n=Número de embriones, (%)=porcentaje.

**Tabla 2. Porcentaje de sexos de los embriones agrupados según la velocidad de su segunda división**

	Oviducto Izquierdo (%)				Oviducto Derecho (%)				Total (%)
Sexo	Rápido	Medio	Lento	Sub total	Rápido	Medio	Lento	Sub total	
<b>Macho</b>	54,14	50,91	49,46	51,79	54,94	52,55	41,84	50,88	51.00
<b>Hembra</b>	45,86	49,09	50,54	48,21	45,06	47,45	58,16	49,12	49.00

**4.2. Relación entre la segunda división embrionaria y la posterior velocidad de desarrollo a blastocistos con la proporción de sexos**

Una vez separados los embriones como R, M o L en función de la división a 3 células, los grupos se separaron de nuevo de acuerdo a su velocidad de crecimiento en el día 3,5, de forma que a los embriones que el día 3,5 estaban en estadio de blastocisto tempranos y blastocistos (tB+B) se les calificó como “Lentos” y a los que estaban en estadio de blastocistos expandidos (exB) se les calificó como “Rápidos”. La única diferencia significativa que se observó, fue que en el grupo que llegó último al estadio de 3 células y que demoró más en completar su crecimiento hasta blastocistos (grupo LL), la mayoría de embriones eran hembras. El resto de los grupos, incluido el grupo de mayor rapidez en los dos estadios señalados, no muestra diferencias significativas de la proporción 50:50 (Tabla 3).

**Tabla 3. Proporción de sexos al considerar la velocidad de la segunda división embrionaria (R=rápido, M=medio y L=lento) y la velocidad de crecimiento hasta día 3,5 (R=rápido y L=lento)**

División a 3 células	Rápido		Medio		Lento	
	RR exB	RL tB+B	MR exB	ML tB+B	LR exB	LL tB+B
<b>Macho</b>	48,95	45,76	53,01	56,47	50,00	<b>42,36*</b>
<b>Hembra</b>	51,05	54,24	46,99	43,53	50,00	<b>57,64*</b>

exB= blastocistos expandidos, tB=blastocisto temprano, B=blastocisto. \*indica diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

#### 4.3. Análisis de la expresión génica en embriones agrupados según la velocidad de la segunda división y la posterior velocidad de desarrollo a blastocisto

Se cuantificó la expresión de mRNA de tres genes en los blastocistos obtenidos de los 6 grupos del apartado anterior. Los embriones se recogieron en el estadio de blastocisto expandido; aquellos que en día 3,5 se encontraban en estadios anteriores de desarrollo se cultivaban *in vitro* hasta alcanzar el estadio de blastocisto expandido. Se analizaron dos genes de pluripotencia *Nanog* (*Nanog homeobox*) y *Pou5f1* (*octamer-binding transcription factor 4*, también conocido como *Oct4*), y un gen de estrés oxidativo, *Osgin2* (*oxidative stress induced growth inhibitor family member 2*). Los blastocistos expandidos provenientes del grupo “RL” y “MR” tuvieron una expresión similar del gen *Osgin2* de los controles *in vivo* “VV”, mientras que en los 4 grupos restantes se observó una mayor expresión del mismo. Para el gen *Nanog* y *Pou5f1*, los grupos “RL” y “MR” mostraron similar expresión que el control y mayor expresión que la mayor parte de grupos restantes (Figura 1).

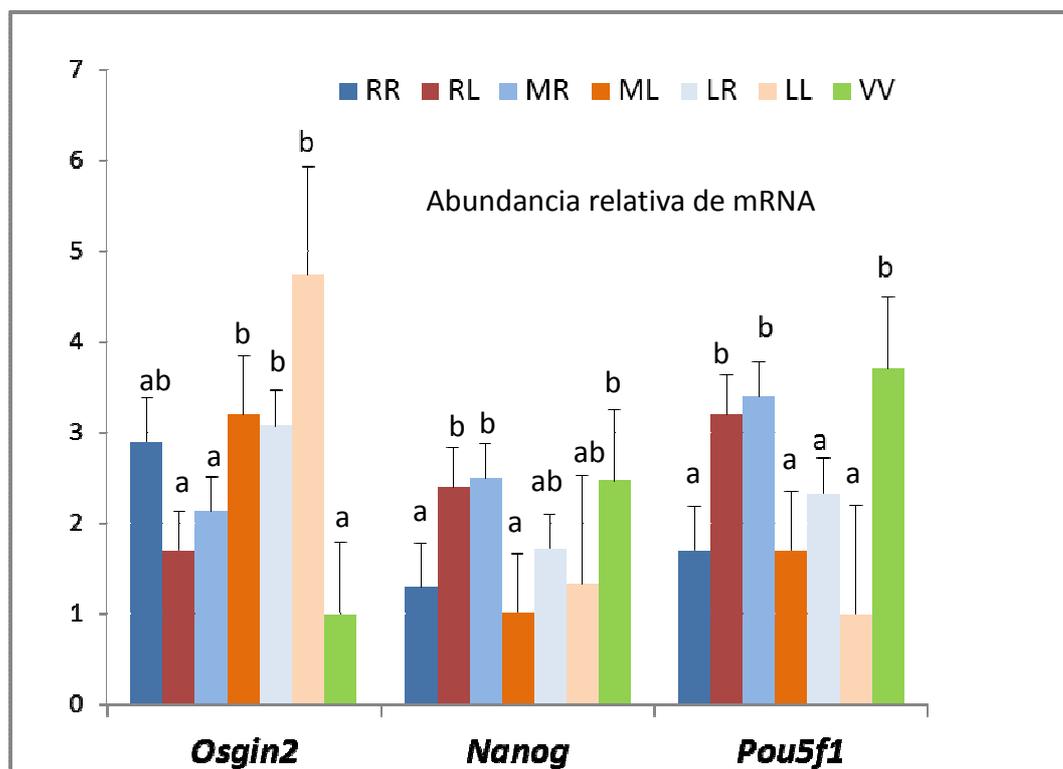


Figura 1. Expresión relativa de genes de pluripotencia y estrés oxidativo en los embriones considerando la velocidad de la segunda división embrionaria y la posterior velocidad de desarrollo a blastocistos. La primera letra indica la velocidad de la segunda división y la segunda letra la velocidad de desarrollo posterior hasta el estadio de blastocisto: RR=rápidos/rápidos, RL=rápidos/lentos, MR= Medio/Rápidos, ML= Medio/Lento, LR=lentos/rápidos, LL=lentos/lentos, VV=*in vivo*. Letras a y b indican diferencias significativas de cada grupo con  $P < 0,05$

## 5. Discusión.

En los embriones de ratón, en el estadio de 2 células comienza la activación del genoma embrionario (EGA) y la expresión de genes del propio embrión, siendo un momento clave del desarrollo embrionario. Por este motivo hemos analizado la relación de la velocidad de la segunda división embrionaria (de 2 a 3 células) con la calidad embrionaria y con la proporción de sexos. En nuestro estudio, no se observaron diferencias en las proporciones del sexo al separarlos según las velocidades de desarrollo en el paso de 2 a 3 células, tanto en embriones provenientes del ovario derecho como del izquierdo. Solo cuando se correlacionó conjuntamente la velocidad de división a 3 células con el siguiente periodo de desarrollo de 3 células a blastocisto, en el grupo de división más lenta (grupo LL) se encontró una distorsión de la proporción del sexo hacia mayor cantidad de hembras. Otros autores han descrito que los embriones macho tienen una velocidad de división más rápida que las hembras (Avery 1989, Xu et al. 1992, Valdivia et al. 1993, Yadav et al. 1993, Peippo y Bredbacka 1995). Sin embargo, nosotros hemos encontrado que los embriones que se desarrollaban más rápido en ambos estadios señalados, no mostraban diferencias en la proporción de sexos (Munne et al. 1993, Ng et al. 1995, Kaminski et al. 1996, Holm et al. 1998). Estas diferencias con otros autores pueden ser debidas a las diferencias en los medios de cultivo, ya que en la actualidad el cultivo *in vitro* de los embriones de ratón se encuentra muy optimizado. Además, como observaron otros autores, encontramos un mayor número de embriones provenientes del ovario derecho (Hollander 1950, Falconer et al. 1961).

Para analizar si la velocidad de la segunda división embrionaria guarda relación con la calidad de los embriones, analizamos la expresión de genes de pluripotencia como son *Nanog* y *Pou5f1 (Oct4)* y un gen de estrés oxidativo, *Osgin 2* (Wrenzycki et al. 2007, Rizos et al. 2008). De acuerdo con los resultados de Market et al (2012) donde la calidad del embrión mejora cuando su crecimiento pre-implantacional es lento (Market et al. 2012), nuestros resultados muestran una mayor calidad embrionaria cuando las velocidades de desarrollo no son las más rápidas (Gutierrez-Adan et al. 2014), indicando que muy probablemente sean los grupos de velocidad de desarrollo

intermedia, los que van a producir mayor implantación y desarrollo. La discordancia con lo propuesto por Tsunoda, acerca de la mejor calidad embrionaria a transferir provendría del desarrollo rápido, creemos que es debida a la diferencia en calidad de los medios de cultivo utilizados (Tsunoda 2005). Por lo tanto, para mejorar la calidad embrionaria *in vitro*, consideramos muy importante la utilización de medios optimizados, como el KSOM (Summers 2013), debido a que se ha comparado con otros medios de cultivo sub-óptimos, los cuales muestran un efecto importante sobre la impronta genética pre-implantacional (Mann et al. 2004), que al transferirse esos embriones, pueden incrementar la probabilidad de desórdenes genéticos, similares a los reportados en humanos, como son los síndromes de Angelman, Beckwith-Wiedemann y Prader-Willi (Nicholls y Knepper 2001, Maher et al. 2003). Debido a ello, posiblemente se pueda explicar la diferencia de nuestros resultados y los de Market, que propone el desarrollo lento (Market et al. 2012), los cuales fueron realizados en medios sub-óptimos como el medio Whitten (Giritharan et al. 2007, Market et al. 2010), en cuyo caso, otros estudios han reportado cómo los medios sub-óptimos causan pérdida de impronta genómica y modificaciones a nivel epigenético en la descendencia del ratón (Fernandez-Gonzalez et al. 2004, Calle et al. 2012).

Si bien nuestros datos de velocidad de desarrollo en medios optimizados no muestran una distorsión del equilibrio entre machos y hembras a nivel *in vitro*, en ambos oviductos y separados en derecho e izquierdo, no descartamos que exista una velocidad de desarrollo diferencial entre machos y hembras. Quizás futuras investigaciones con ayuda de la tecnología de imágenes en lapsos de tiempo (ILT), revelen mejor el comportamiento de acuerdo al sexo, que los sistemas de cultivo *in vitro* parecen solapar.

# **Discusión General**



Desde tiempos antiguos, las civilizaciones a través de la historia han intentado manipular el sexo de la descendencia, numerosos filósofos realizaron supuestos de cómo conseguirlo sin una base científica sólida que asegurara el éxito. Además, se ha observado a lo largo de la evolución de las especies, que muchas poblaciones se comportan de manera diferente respecto a la proporción del sexo, no reflejando el equilibrio teórico 50:50 entre machos y hembras. De ahí que muchas hipótesis hayan sido formuladas para explicar dicho fenómeno, como es el caso de la hipótesis de la competencia por el apareamiento (Hamilton 1967), la competencia por el recurso (Clark 1978), la hipótesis Fisheriana (Fisher 1930), y la hipótesis de la condición materna de Trivers y Willard (Trivers y Willard 1973). Esta hipótesis es la más aceptada y numerosos estudios la han utilizado para justificar sus resultados. En base a estas hipótesis se han descrito múltiples factores implicados en la distorsión del equilibrio sexual, como son la concentración de glucosa, los niveles hormonales, el rango de dominancia, la edad parental, el tamaño de camada, el orden de paridad, la placentación, los distintos tipos de dietas, el tiempo de ovulación, tiempo de fecundación, concentración de testosterona en el fluido folicular, el estrés, la estacionalidad, etc.

Muchos trabajos experimentales sobre proporción de sexo presentan resultados dispares e incluso contradictorios (Cameron, 2004). Nuestra hipótesis de partida es que en el caso de las especies politocas, debido a las diferencias fisiológicas entre ovarios, oviductos y úteros derechos e izquierdos, los resultados de proporción del sexo de ambos lados se deben considerar por separado, ya que en muchos casos los sesgos producidos en un lado puede que se compensen con el otro lado, de forma que el resultado final no presenta distorsión. Existen pocos estudios (Endo 1987, Clark y Galef 1990, Hylan et al. 2009), que dieron la importancia a cada uno de los lados de forma independiente; por lo que resulta altamente estimulante analizar algunos factores que han sido considerados importantes en la proporción del sexo desde una perspectiva de la bilateralidad de los aparatos reproductores femeninos.

En mamíferos el macho es el sexo heterogamético y el espermatozoide “X” o “Y” que fecunde un óvulo es el que determina el sexo del animal. Aunque como resultado de la meiosis se espera el mismo número de gametos portadores del cromosoma “X” o “Y”, como ya se describió en la introducción, existen múltiples eventos y factores que ejercen influencia sobre ambos padres, y no siempre se mantiene el equilibrio de proporción de los sexos teórico. En el capítulo I, hemos querido

comenzar analizando la posible influencia paterna en la proporción del sexo, mientras que en el resto de capítulos analizamos la contribución materna. El objetivo de este primer capítulo fue determinar si el factor paterno influía o no en la proporción del sexo. Si bien se ha descrito que la espermatogénesis produce igual cantidad de espermatozoides portadores de cromosomas “X” e “Y” (Guttenbach et al. 1997, Barczyk 2001), existen trabajos que han descrito diferencias de motilidad entre espermatozoides portadores del cromosoma “X” o “Y” (Penfold et al., 1998), y diferencia en masa y peso debido a las diferencias de tamaño del cromosoma “X” e “Y”; además se ha descrito que algunos eyaculados y/o algunas poblaciones espermáticas pueden contener distinto porcentaje de espermatozoides “X” o “Y” (Chandler et al. 2007). Algunos resultados dan mucha importancia al factor paterno como modulador de la proporción sexual (Khoury et al. 1984, James 1996, James 2008, Edwards y Cameron 2013, Almiñana et al. 2014). Por ejemplo se ha publicado que la proporción de machos y hembras en el momento de la fecundación en humanos puede ser cercana a 170 machos por 100 hembras (Pergament et al., 2002). Trabajos más recientes estiman que en humanos la proporción del sexo varía entre 1,29 y 1,50 en los embriones producidos por fecundación *in vitro* (Tarin et al. 2014). Es importante por lo tanto analizar mecanismos que estuvieran ligados al macho y que pudieran alterar la proporción de sexos.

Para identificar fácilmente el sexo de los embriones y fetos hemos usado un ratón transgénico que tiene incorporado una construcción genética, que expresa la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP), en uno de sus cromosomas “X” (Nakanishi et al. 2002, Kobayashi, Isotani et al. 2006). Cuando cruzamos este macho transgénico con una hembra no transgénica, se produce una descendencia en la que los machos no llevan el marcador transgénico (sin X-EGFP), mientras que todas las hembras llevan el cromosoma “X” del macho transgénico (con X-EGFP), por lo que la expresión del marcador EGFP bajo la luz ultravioleta permite seleccionar los embriones de sexo femenino (Anexo 1). Esto nos permitió registrar los datos de proporción primaria (estadios de blastocisto) y secundaria de los sexos (estadios fetales, Anexo 2). Resultados anteriores han demostrado que algunos ratones transgénicos, como consecuencia de la modificación genética pueden alterar la proporciones de sexos (Sipilä et al. 2002, Yeung et al. 2002). En nuestro caso el marcador se encuentra en el cromosoma “X” por lo que lo primero que analizamos fue

---

si la presencia del marcador fluorescente en el cromosoma “X” podría tener algún efecto en la proporción de sexos. Los resultados del capítulo I han determinado que la presencia del transgén no afecta la proporción de sexos ni primaria ni secundaria tanto *in vivo* como *in vitro*.

Hemos observado que cuando se analiza la proporción de sexos obtenidos con espermatozoides del conducto deferente o del epidídimo, la cepa CD1 produce una menor proporción de machos cuando la fecundación *in vitro* se realiza con espermatozoides obtenidos del conducto deferente. Estos resultados sugieren que la población de espermatozoides del conducto deferente (que contienen solo un 2% de la cantidad total de gametos presentes en los conductos excretores), que han sufrido mayor tiempo de maduración que los de la cola del epidídimo (que contienen el 70%) y que generalmente sirven en el caso del ratón para cambiar el pH vaginal, pero difícilmente sobreviven para llegar a fecundar al ovocito, manifiestan un comportamiento diferencial en su capacidad para fecundar el ovocito *in vitro* en función de que porten el cromosoma “X” o “Y”. Se ha sugerido que los espermatozoides que portan el cromosoma “Y” de menor masa que los que portan el “X” y con diferencia en motilidad, puedan tener mayor habilidad para fertilizar el ovocito y menor supervivencia (James 1996). Si los espermatozoides del vaso deferente que son más viejos que los del epidídimo han perdido como consecuencia de su edad, cierta viabilidad, esto podría explicar que las diferencias en supervivencia entre espermatozoides “X” e “Y” fueran más evidentes, dando una ventaja a los más longevos, que corresponderían a los que portan el cromosoma “X”.

Hemos observado también la importancia de las contracciones uterinas en la modulación de la proporción de sexos. En condiciones normales, el 20% de los embriones que se dividen a dos células más rápido, tanto en el oviducto derecho como en el izquierdo, presentan mayor proporción de machos, indicando que los espermatozoides que portan el cromosoma “Y” son capaces de fecundar más rápido que los que portan el cromosoma “X”. Además, cuando se inhiben las contracciones del músculo liso del útero mediante el uso de la droga *Ritodrine hydrochloride* (Guidobaldi et al. 2012), no se altera la proporción de machos en los embriones que se dividen más rápido, indicando que la ventaja en rapidez para fecundar de los espermatozoides “Y” desaparece en ausencia de contracciones uterinas que ayuden a las poblaciones espermáticas a desplazarse al lugar de fecundación.

En los siguientes capítulos hemos profundizado en factores que afectan a la madre que pudieran tener un efecto en la proporción de sexos. Las diferencias entre los oviductos y úteros derecho e izquierdo, se observa cuando a ratonas de una condición corporal menor, se las somete a estrés alimenticio mediante ayunos programados en etapas pre-ovulatoria, pre-concepcional, pre-implantacional e implantacional, como se observa en el capítulo II. Se sabe que las distintas dietas hiper-calóricas como las altas en grasa (Rosenfeld et al. 2003), las bajas en proteína (Fernandez-Twinn et al. 2003), o micronutrientes (McMillen y Robinson 2005), las ricas en ácidos grasos poli-insaturados (Fountain et al. 2008) o en determinados metabolitos (Jauniaux et al. 2005), crean una disfunción ovárica y uterina que afecta a la proporción de sexos. Ninguna de las dietas utilizadas modificó el porcentaje de sexos esperado, ni en CD1 ni en B6C3F1, cuando analizábamos el global de fetos sumando ambos cuernos uterinos. Sin embargo, al analizar los cuernos por separado, se observaron diferencias en la cepa B6C3F1 de menor peso y aptitud materna. En el cuerno derecho el grupo 7F/2 es distinto al grupo control, y en el cuerno izquierdo los dos grupos de restricción son distintos al control. Se observa que esta disminución tiene una relación con la disminución en el número de fetos, y se observa una mayor presencia de fetos macho en el cuerno derecho, algo que ya ha sido observado en otras especies (Buchanan 1974, O y Chow 1987, Riboni 2002, Hylan et al. 2009, Clark y Galef 1990, Endo, Goto, y Sakai 1987). En el útero izquierdo se observa una disminución de la proporción de sexo, por eso al considerar el global de ambos cuernos uterinos no se encuentran diferencias, indicando la importancia de analizar ambos lados por separados en los experimentos de análisis de proporción de sexos. Si consideramos que si el ovario derecho ovula antes y sus ovocitos tienen más posibilidades de ser fecundados por espermatozoides portadores del cromosoma “Y”, también es más probable que en condiciones de restricción se produzcan menos embriones de sexo masculino, y esto es justamente lo que se observa para el grupo más estresante 7F/2. Por el contrario, si el ovario izquierdo ovula un poco más tarde que el derecho, tiene más posibilidades de ser fecundado por espermatozoides portadores del cromosoma “X”, es más probable que sea un embrión hembra el que en condiciones de restricción de alimento tenga más problemas para generarse y por eso se observa menor número de implantaciones en ese cuerno.

En los periodos cercanos a la implantación (dieta R<sub>3-4</sub>), la restricción produce en la cepa B6C3F1 una disminución de la proporción de machos en el útero derecho y un

incremento en el útero izquierdo comparado con los controles, con menor implantación de fetos en ambos úteros. Hay que considerar que estos embriones son producidos de manera natural y por ello no interfiere en su calidad los suplementos hormonales para la superovulación (Sakai y Endo 1987). La pérdida de fetos en condiciones de restricción podría explicar la disminución de la proporción de sexo en el útero derecho y el aumento en el izquierdo. Nuestros datos coinciden con trabajos previos en roedores que demuestran que el ovario derecho ovula más, produce mayor cantidad de machos y es en el útero derecho donde hay mayor pérdida de hembras (Bacon y McClintock 1999, Pratt y Lisk 1991). Los efectos de restricción de alimento no alteraron la proporción de sexos ni el tamaño de camada en la cepa CD1 de mejor condición corporal y aptitudes maternas, indicando que quizá las condiciones de estrés no fueron adecuadas para esta cepa, y que quizá en unas condiciones de disminución del tamaño de camada también se viera afectada la proporción de sexos.

La alteración de la proporción de sexo observada cuando se indujo químicamente diabetes mediante inyección única de Aloxano (200 mg/Kg) en periodos peri-implantacionales corroboran lo ya descrito en otros trabajos, donde un fuerte estrés glucémico durante el periodo peri-implantacional, modifica las proporciones del sexo (Rjasanowski et al. 1998, Machado et al. 2001) hacia la obtención de mayor cantidad de machos (Machado et al. 2001) en momentos cercanos a la implantación (Cameron 2004). Los datos coinciden también con lo descrito en ambientes hipoglucémicos inducidos por dexametasona (DEX) que alteran la proporción del sexo hacia hembras (Cameron et al. 2008). Se observa una disminución en el número de embriones recuperados de las hembras tratadas con aloxano, aunque esta disminución no es significativa, esta tendencia explicaría la mayor proporción de machos debida a la pérdida de embriones hembras. Sin embargo, entre los embriones que sobreviven, los machos parecen ser más sensibles a la glucosa, ya que la hiperglicemia afectó al número total de células solo en los embriones macho y redujo significativamente la masa celular interna de machos y hembras comparados con el control. Estos datos de reducción de la MCI se pueden explicar por un aumento de la apoptosis (que afecta preferencialmente a la MCI), algo que ya ha sido observado en embriones en presencia de altas concentraciones de glucosa (Moley et al. 1998). Esta reducción en el número de células se refleja también en una reducción del porcentaje de implantación.

Las hembras sometidas a restricción de alimento pre-concepcional no sufrieron alteración de la proporción de sexos, indicando que este factor no tiene consecuencias en la proporción del sexo. Cabe señalar, que hemos analizado blastocistos y puede que el efecto se manifieste después en la implantación o el desarrollo embrionario. Por lo tanto no podemos concluir que la dieta pre-concepcional no afecte la proporción secundaria de sexos.

Debido a que muchas de las diferencias observadas solo eran evidentes cuando analizamos los cuernos uterinos de manera independiente, decidimos en el capítulo III analizar mediante hemi-ovariectomías las diferencias en la proporción secundaria de los sexos que se pueden originar por las diferencias entre ovarios y úteros derechos e izquierdos, y determinar si existe alguna preferencia de un sexo determinado por un lugar de implantación en el útero. Una semana después de la ovariectomía, se produce una hipertrofia del ovario que se manifiesta en que las ratonas tengan unos tamaños de camada muy similar a los que tendrían con ambos ovarios. En relación a la capacidad uterina se han encontrado camadas más grandes en el grupo de OVX-I, indicando mayor capacidad del útero derecho para el desarrollo de los fetos o mayor capacidad de ovular del ovario derecho. En relación a las observaciones de que el ovario derecho produce más machos que hembras (Hylan et al. 2009, Clark y Galef 1990, Clark, Ham, y Galef 1994, Vickers 1969), en nuestro experimento con hemi-ovarectomias no encontramos diferencia entre el porcentaje total de sexos en el cuerno uterino derecho ni izquierdo. Tanto con hembras consanguíneas como no consanguíneas, no observamos una desviación de la proporción de sexo esperada 50:50.

Un aspecto interesante observado fue la disposición de implantación intrauterina de los fetos machos y hembras en cada cuerno uterino. Para el análisis dividimos al útero en 4 secciones proporcionales, siendo la primera más cercana al ovario y la última más cercana al cérvix. En ratonas B6 con ovariectomía obtuvimos un aumento de implantaciones hembras en el segmento más cercano al cérvix. Hay que indicar que esta región más cercana al cérvix es la que recibe menor riego de la aorta ovárica, siendo posiblemente el último lugar que seleccionaría un embrión para implantar, y es posible que solo los embriones más retrasados en desarrollo encuentren esta disposición para implantar. Son por lo tanto las hembras que generalmente se desarrollan más lentamente, las que seleccionarían el lugar de implantación después que el de los machos, lo cual explicaría por qué el extremo final del útero tiene mayor proporción de

---

hembras. Este efecto también se observa, aunque en menor en las hembras CD1, probablemente por su mejor condición corporal no existan tan claras diferencias entre las distintas regiones del útero. También obtuvimos en la sección más cercana al cérvix que los pesos en las hembras era menor que el peso de hembras y machos en las otras secciones. Nuestra hipótesis es que como los embriones con desarrollo más lento son hembras, se implantan en las regiones que los machos y los otros embriones hembra de división más rápida han dejado, de tal forma que las partes más alejadas del ovario, las cuales tienen peor flujo sanguíneo, son las únicas disponibles para la implantación de los embriones hembra de desarrollo más lento.

A diferencia de lo observado por otros autores, cuando utilizamos la cepa consanguínea B6, no encontramos diferencias en el peso fetal por estar al lado de hermanos del mismo sexo o de sexo contrario, por la posible influencia de los niveles de testosterona o estrógenos (Wise y Christenson 1992, Vom Saal 1999). Es posible que la variabilidad genética de embriones híbridos no consanguíneos, tenga un efecto sobre estas condiciones, que en cepas consanguíneas no se aprecien. Por otra parte, las diferencias puede que no sean visibles al día 16 de desarrollo en el que realizamos nuestras observaciones.

En el capítulo IV, hemos analizado si la velocidad de división a tres células y la posterior velocidad de desarrollo a blastocistos, guardan una relación con la calidad embrionaria y con la proporción de sexos. Hemos seleccionado la velocidad de división a 3 células, porque este es un momento clave del desarrollo embrionario en el ratón, ya que en el estadio de 2 células comienzan la activación del genoma embrionario (EGA) y la expresión de genes del propio embrión. Además una selección temprana de los embriones evitaría el mantener los embriones en cultivo *in vitro* y transferir en etapas más tempranas de desarrollo el embrión de mayor calidad y de un sexo determinado. Sin embargo, no hemos observado diferencias en las proporciones del sexo al separarlos según las velocidades de desarrollo en el paso de 2 a 3 células, tanto en embriones provenientes del ovario derecho como del izquierdo. Solamente los embriones que se desarrollan a blastocisto más lentamente presentan una mayor proporción de hembras. Estos resultados son contrarios a otros que han descrito que el cultivo *in vitro* acelera la velocidad de división de los embriones de sexo masculino (Avery, 1989; Xu et al., 1992; Valdivia et al., 1993; Yadav, King y Betteridge, 1993; Peippo y Bredbacka, 1995). Las diferencias pueden ser debidas a los distintos sistemas de cultivo utilizados,

ya que en la actualidad el cultivo *in vitro* de ratón está muy optimizado. Los experimentos nos han permitido también confirmar que el ovario derecho produce más embriones que el izquierdo.

En relación a la calidad de los embriones, hemos analizado la expresión de tres genes relacionados con pluripotencia y estrés oxidativo. Aunque tradicionalmente se han considerado los embriones que se desarrollan más rápido son los que tienen mayor calidad, recientemente se ha indicado que los embriones que se desarrollan muy rápido o muy lento no son los que tienen mayor calidad ni los que van a producir mayores preñeces (Gutierrez-Adan et al., 2014). En consistencia con estas observaciones, nuestros resultados muestran que los grupos que tienen una expresión de los genes analizados similar a los embriones producidos *in vitro* son los embriones con una velocidad de división intermedia. Por una parte todos los que se dividen lentamente a 3 células tienen distinta expresión que el grupo *in vivo*. Mientras que en el grupo de división rápida a 3 células, aquellos que posteriormente se dividen más lentamente a blastocisto presentan una expresión génica más similar al grupo *in vivo* que los que se dividen entre 3 células y blastocisto de forma más rápida. Por el contrario, en el grupo de división a tres células intermedia, los embriones que se dividen más rápido presentan más similitud con la expresión del grupo control que los que se dividen más lentamente. Por lo tanto, la división a tres células ya nos podría indicar los embriones más lentos que deberíamos descartar, pero para identificar los mejores dentro de los grupos de división rápida y media a 3 células deberíamos cultivarlos hasta el estadio de blastocisto. Para confirmar estos datos debemos realizar transferencias embrionarias para determinar aquellos grupos que producen mayores tasas de preñez.

En esta tesis nuestros resultados muestran que las proporciones del sexo pueden ser moduladas tanto por factores paternos como maternos. En condiciones naturales las contracciones uterinas favorecen que los espermatozoides portadores del cromosoma “Y” lleguen antes a fertilizar los ovocitos, confirmando que las diferencias fenotípicas que existen entre espermatozoides portadores de un cromosoma “X” o “Y” pueden modular la proporción de sexos (Capítulo I). En relación con la contribución materna, nuestros datos indican que la proporción del sexo se puede modular por las pérdidas embrionarias por estrés nutricional y fallo de implantación (en la proporción primaria del sexo) como se ha observado en el Capítulo II. Además, nuestros datos indican que en los estudios sobre proporción de sexo en especies politocas se deben analizar por

separado, los resultados obtenidos de cada cuerno uterino, ya que las diferencias morfológicas de los órganos reproductivos del lado derecho e izquierdo, así como las diferencias en flujo sanguíneo a estos órganos, pueden producir resultados distintos en cada cuerno, que pueden pasar desapercibidos cuando se analizan los resultados de forma global (Capítulo III). Además hemos documentado que una mayor proporción de hembras tienden a implantarse en lugares cercanos al cérvix, siendo estos fetos de menor tamaño que el resto de sus hermanos (Capítulo III). Finalmente hemos observado que en un medio de cultivo *in vitro* óptimo, solo podemos encontrar una relación entre velocidad de división y sexo en el grupo de embriones que se desarrolla más lentamente. Además, analizar la velocidad de división a 3 células nos permite identificar que los embriones de división más lenta tienen una mala calidad embrionaria (cuantificada por expresión de genes candidato) mientras que en el resto de embriones, necesitamos también analizar la velocidad de división a blastocisto para poder identificar los grupos que presentan una mejor expresión genética (Capítulo IV).



# Conclusiones



- 1.- La presencia del marcador pCAGGS-EGFP en el cromosoma “X” de nuestro modelo de ratón transgénico (CX38) no afecta la capacidad fecundante de los espermatozoides portadores del cromosoma “X” ni a la viabilidad de los embriones portadores de dicho transgén.
- 2.- La diferencia en el grado de maduración entre los espermatozoides del vaso deferente y del epidídimo es un factor que puede modular la proporción de sexos.
- 3.- La motilidad uterina es fundamental para que los espermatozoides portadores del cromosoma “Y” alcancen más rápidamente la capacidad para fertilizar que los espermatozoides portadores del cromosoma “X”.
- 4.- Durante el periodo peri-implantacional, la restricción de alimento y la diabetes inducida químicamente por aloxano afecta la proporción de sexos reduciendo la viabilidad de los embriones de un determinado sexo.
- 5.- Debido a las diferencias bilaterales (derecha-izquierda) de los órganos reproductores internos en la ratona, en los análisis de proporción de sexo se deben analizar de forma independiente los resultados obtenidos en cada lado.
- 6.- En hembras ovariectomizadas una mayor proporción de hembras de tamaño menor que el resto de sus hermanos, tienden a implantarse en lugares cercanos al cérvix.
- 7.- La velocidad de división pre-implantacional guarda relación con la calidad embrionaria siendo los embriones de división más lenta predominantemente hembras.



# **Bibliografía**



- 
- Alexenko, A. P., J. Mao, M. R. Ellersieck, A. M. Davis, J. J. Whyte, C. S. Rosenfeld and R. M. Roberts (2007). "The contrasting effects of ad libitum and restricted feeding of a diet very high in saturated fats on sex ratio and metabolic hormones in mice." Biol Reprod**77**(4): 599-604.
  - Almiñana, C., I. Caballero, P. R. Heath, S. Maleki-Dizaji, I. Parrilla, C. Cuello, M. A. Gil, J. L. Vazquez, J. M. Vazquez, J. Roca, E. A. Martinez, W. V. Holt and A. Fazeli (2014). "The battle of the sexes starts in the oviduct: modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa." BMC Genomics**15**(1): 293.
  - Altmann, J. ( 1980 ). "Baboon Mothers and Infants." Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
  - Andersson, R. and S. Bergstrom (1998). "Is maternal malnutrition associated with a low sex ratio at birth?" Hum Biol**70**(6): 1101-1106.
  - Armitage, K. B. (1987). "Do Female Yellow-Bellied Marmots Adjust the Sex Ratios of Their Offspring?" The American Naturalist**129**(4): 19.
  - Austad S, S. M. (1986). "Sex-ratio manipulation in the common opossum." Nature**324**: 58–60.
  - Avery, B. (1989). "Impact of asynchronous ovulations on the expression of sex-dependent growth rate in bovine preimplantation embryos." J Reprod Fertil**87**(2): 627-631.
  - Avery, B., C. B. Jorgensen, V. Madison and T. Greve (1992). "Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos." Mol Reprod Dev**32**(3): 265-270.
  - Avery, B., V. Madison and T. Greve (1991). "Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos." Theriogenology**35**(5): 953-963.
  - Avni, R., T. Raz, I. E. Biton, V. Kalchenko, J. R. Garbow and M. Neeman (2012). "Unique in utero identification of fetuses in multifetal mouse pregnancies by placental bidirectional arterial spin labeling MRI." Magn Reson Med**68**(2): 560-570.
  - Bacon, S. J. and M. K. McClintock (1999). "Sex ratio bias in postpartum-conceived Norway rat litters is produced by embryonic loss in midpregnancy." J Reprod Fertil**117**(2): 403-411.
  - Baird, D. D. and E. C. Birney (1985). "Bilateral distribution of implantation sites in small mammals of 22 North American species." J Reprod Fertil**75**(2): 381-392.
  - Baker, D. H. (2005). "Comparative nutrition and metabolism: explication of open questions with emphasis on protein and amino acids." Proc Natl Acad Sci U S A**102**(50): 17897-17902.
  - Baker, T. G., S. Challoner and P. S. Burgoyne (1980). "The number of oocytes and the rate of atresia in unilaterally ovariectomized mice up to 8 months after surgery." J Reprod Fertil**60**(2): 449-456.

- Balasch, J., J. L. Balleca, C. Pimentel, M. Creus, F. Fabregues and J. A. Vanrell (1994). "Late low-dose pure follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in intra-uterine insemination cycles." Hum Reprod**9**(10): 1863-1866.
- Balasch, J., J. Penarrubia, M. Marquez, S. R. Mirkin, F. Carmona, P. N. Barri and J. A. Vanrell (1994). "Ovulation side and ovarian cancer." Gynecol Endocrinol**8**(1): 51-54.
- Baligar, P. N. and B. B. Kaliwal (2004). "Carbofuran induced block of compensatory ovarian growth in hemicastrated albino mice." Toxicology**204**(2-3): 87-95.
- Barczyk, A. (2001). "Sperm capacitation and primary sex ratio." Med Hypotheses**56**(6): 737-738.
- Bechard, A., A. Nicholson and G. Mason (2012). "Litter size predicts adult stereotypic behavior in female laboratory mice." J Am Assoc Lab Anim Sci**51**(4): 407-411.
- Beratis, N. G., A. Asimacopoulou and A. Varvarigou (2008). "Association of secondary sex ratio with smoking and parity." Fertil Steril**89**(3): 662-667.
- Bermejo-Alvarez, P., D. Rizos, P. Lonergan and A. Gutierrez-Adan (2011). "Transcriptional sexual dimorphism during preimplantation embryo development and its consequences for developmental competence and adult health and disease." Reproduction**141**(5): 563-570.
- Bermejo-Alvarez, P., D. Rizos, P. Lonergan and A. Gutierrez-Adan (2011). "Transcriptional sexual dimorphism in elongating bovine embryos: implications for XCI and sex determination genes." Reproduction**141**(6): 801-808.
- Bermejo-Alvarez, P., D. Rizos, D. Rath, P. Lonergan and A. Gutierrez-Adan (2008). "Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro." Physiol Genomics**32**(2): 264-272.
- Bermejo-Alvarez, P., D. Rizos, D. Rath, P. Lonergan and A. Gutierrez-Adan (2010). "Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts." Proc Natl Acad Sci U S A**107**(8): 3394-3399.
- Bermejo-Alvarez, P., R. M. Roberts and C. S. Rosenfeld (2012). "Effect of glucose concentration during in vitro culture of mouse embryos on development to blastocyst, success of embryo transfer, and litter sex ratio." Mol Reprod Dev**79**(5): 329-336.
- Bernardi, M. L. and C. Delouis (1996). "Sex-related differences in the developmental rate of in-vitro matured/in-vitro fertilized ovine embryos." Hum Reprod**11**(3): 621-626.
- Bird, E. and R. J. Contreras (1986). "Maternal dietary sodium chloride levels affect the sex ratio in rat litters." Physiol Behav**36**(2): 307-310.
- Blumberg, M., J. Mennella, H. Moltz and M. McClintock "Facultative sex-ratio adjustment in Norway rats: litters born asynchronously are female biased."

- 
- Boutteville, C., S. J. Muasher, A. A. Acosta, H. W. Jones and Z. Rosenwaks (1987). "Results of in vitro fertilization attempts in patients with one or two ovaries." Fertil Steril**47**(5): 821-827.
  - Bredbacka, K. and P. Bredbacka (1996). "Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro." J Reprod Fertil**106**(2): 169-172.
  - Brewer, C. J. and A. H. Balen (2010). "The adverse effects of obesity on conception and implantation." Reproduction**140**(3): 347-364.
  - Bronson, F. H. and F. A. Marsteller (1985). "Effect of short-term food deprivation on reproduction in female mice." Biol Reprod**33**(3): 660-667.
  - Brown, G. R. (2000). "Sex-biased investment in nonhuman primates: can Trivers & Willard's theory be tested?" Animal Behaviour**61**: 683-694.
  - Brown, G. R. and J. B. Silk (2002). "Reconsidering the null hypothesis: Is maternal rank associated with birth sex ratios in primate groups?" Proc Natl Acad Sci U S A**99**(17): 11252-11255.
  - Bruce, H. M., A. G. Renwick and C. A. Finn (1968). "Effect of post-coital unilateral ovariectomy on implantation in mice." Nature**219**(5155): 733-734.
  - Buchanan, G. D. (1974). "Asymmetrical distribution of implantation sites in the rat uterus." Biol Reprod**11**(5): 611-618.
  - Burden, H. W., I. E. Lawrence, C. P. Smith, J. Hoffman, M. Leonard, D. J. Fletcher and C. A. Hodson (1986). "The effects of vagotomy on compensatory ovarian hypertrophy and follicular activation after unilateral ovariectomy." Anat Rec**214**(1): 61-66.
  - Buren, J. L., Hui-Xia. Jensen, Jørgen. Eriksson, J W (2002). "Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes." European Journal of Endocrinology**146**: 419-429.
  - Burgoyne, P. S. (1993). "A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice." Development**117**(1): 341-345.
  - Cagnacci, A., A. Renzi, S. Arangino, C. Alessandrini and A. Volpe (2005). "Interplay between maternal weight and seasons in determining the secondary sex ratio of human offspring." Fertil Steril**84**(1): 246-248.
  - Calle, A., R. Fernandez-Gonzalez, P. Ramos-Ibeas, R. Laguna-Barraza, S. Perez-Cerezales, P. Bermejo-Alvarez, M. A. Ramirez and A. Gutierrez-Adan (2012). "Long-term and transgenerational effects of in vitro culture on mouse embryos." Theriogenology**77**(4): 785-793.
  - Cameron, E. Z. (2004). "Facultative adjustment of mammalian sex ratios in support of the Trivers-Willard hypothesis: evidence for a mechanism." Proc Biol Sci**271**(1549): 1723-1728.
  - Cameron, E. Z., P. R. Lemons, P. W. Bateman and N. C. Bennett (2008). "Experimental alteration of litter sex ratios in a mammal." Proc Biol Sci**275**(1632): 323-327.

- Cameron, E. Z. and W. L. Linklater (2007). "Extreme sex ratio variation in relation to change in condition around conception." Biol Lett**3**(4): 395-397.
- Carter, A. M. M., A (2007). "Evolution of the Placenta in Eutherian Mammals." Placenta**28**: 259-262.
- Carvalho, R. V., M. R. Del Campo, A. T. Palasz, Y. Plante and R. J. Mapletoft (1996). "Survival rates and sex ratio of bovine IVE embryos frozen at different developmental stages on day 7." Theriogenology**45**(2): 489-498.
- Casida, L. E., C. O. Woody and A. L. Pope (1966). "Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the ewe." J Anim Sci**25**(4): 1169-1171.
- Cassar, G., R. de la Fuente, Z. Yu, G. J. King and W. A. King (1995). "Sex chromosome complement and developmental diversity in pre-and post-hatching porcine embryos." Theriogenology**44**(6): 879-884.
- Cassar, G., W. A. King and G. J. King (1994). "Influence of sex on early growth of pig conceptuses." J Reprod Fertil**101**(2): 317-320.
- Cassinello, J. (1996). "High-Ranking Females Bias Their Investment in Favour of Male Calves in Captive *Ammotragus lervia*." Behavioral Ecology and Sociobiology**38**(6): 417-424
- Cassinello, J. (1996). "High-Ranking Females Bias Their Investment in Favour of Male Calves in Captive *Ammotragus lervia*." Behavioral Ecology and Sociobiology**38**(6): 417-424.
- Catalano, R., T. Bruckner, J. Gould, B. Eskenazi and E. Anderson (2005). "Sex ratios in California following the terrorist attacks of September 11, 2001." Hum Reprod**20**(5): 1221-1227.
- Catt, S. L. O. B., J.K., Maxwell, W.M.C., Evans, G (1997). "Effects of rate of development of in vitro-produced ovine embryos on sex ratio and in vivo survival after embryo transfer." Theriogenology**48**(8).
- Check, J. H., K. Nowroozi, J. Choe and C. Dietterich (1991). "Influence of endometrial thickness and echo patterns on pregnancy rates during in vitro fertilization." Fertil Steril**56**(6): 1173-1175.
- Chandler, J. E., T. M. Taylor, A. L. Canal, R. K. Cooper, E. B. Moser, M. E. McCormick, S. T. Willard, H. E. Rycroft and G. R. Gilbert (2007). "Calving sex ratio as related to the predicted Y-chromosome-bearing spermatozoa ratio in bull ejaculates." Theriogenology**67**(3): 563-571.
- Chávez, R. and R. Domínguez (1994). "Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle." J Endocrinol**140**(2): 197-201.
- Clark, A. B. (1978). "Sex Ratio and Local Resource Competition in a Prosimian Primate." Science**14**(4351): 163-165.
- Clark, A. B. (1978). "Sex Ratio and Local Resource Competition in a Prosimian Primate." Science**14**(4351 ): 163-165

- 
- Clark, M. M. and B. G. Galef (1988). "Effects of uterine position on rate of sexual development in female Mongolian gerbils." Physiol Behav**42**(1): 15-18.
  - Clark, M. M. and B. G. Galef, Jr. (1990). "Sexual segregation in the left and right horns of the gerbil uterus: "the male embryo is usually on the right, the female on the left" (Hippocrates)." Dev Psychobiol**23**(1): 29-37.
  - Clark, M. M., B. G. Galef, Jr. and F. S. vom Saal (1991). "Nonrandom sex composition of gerbil, mouse, and hamster litters before and after birth." Dev Psychobiol**24**(2): 81-90.
  - Clark, M. M., M. Ham and B. G. Galef, Jr. (1994). "Differences in the sex ratios of offspring originating in the right and left ovaries of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)." J Reprod Fertil**101**(2): 393-396.
  - Clutton-Brock, T. H. and G. R. Iason (1986). "Sex ratio variation in mammals." Q Rev Biol**61**(3): 339-374.
  - Cohen J, S. I. (1998). That's amazing, isn't it?, *New Scientist*. **17**: 24-28.
  - Crawford, M. A. D., W. Meadows, N. (1987). "Gender differences at birth and differences in fetal growth." Human Reproduction**2**(6): 517-520.
  - Darwin, C. (1871 ). "The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex." Murray London.
  - Diamond, M. P., K. H. Moley, A. Pellicer, W. K. Vaughn and A. H. DeCherney (1989). "Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development." J Reprod Fertil**86**(1): 1-10.
  - Dickinson, H. and L. Parker (1994). "Do alcohol and lead change the sex ratio?" J Theor Biol**169**(3): 313-315.
  - Dominko, T. and N. L. First (1997). "Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development." Mol Reprod Dev**47**(4): 456-467.
  - Drickamer, L. C. (1990). "Seasonal variation in fertility, fecundity and litter sex ratio in laboratory and wild stocks of house mice (*Mus domesticus*)." Lab Anim Sci**40**(3): 284-288.
  - Echavarri, R. A. and R. Ezcurra (2010). "Education and gender bias in the sex ratio at birth: evidence from India." Demography**47**(1): 249-268.
  - Edwards, A. M. and E. Z. Cameron (2013). "Forgotten fathers: paternal influences on mammalian sex allocation." Trends Ecol Evol.
  - Edwards, L. J. and I. C. McMillen (2001). "Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation." J Physiol**533**(Pt 2): 561-570.
  - Edwards, R. (1986). "Causes of early embryonic loss in human pregnancy." Human reproduction**1**(3): 185-198.
  - Edwards, R. G., S. B. Fishel, J. Cohen, C. B. Fehilly, J. M. Purdy, J. M. Slater, P. C. Steptoe and J. M. Webster (1984). "Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility." J In Vitro Fert Embryo Transf**1**(1): 3-23.

- Ehrlich, S., B. Eskenazi, M. Hedderson and A. Ferrara (2012). "Sex ratio variations among the offspring of women with diabetes in pregnancy." Diabetic Medicine**29**(9): e273-e278.
- Endo, A., T. Goto and N. Sakai (1987). "Distribution by sex of mouse fetuses in the intrauterine position." Gamete Res**16**(1): 79-82.
- Endo, A. G., T. Sakai, N. (1987). "Distribution by Sex of Mouse Fetuses in the Intrauterine Position." Gamete Research**16**: 79-82.
- Erbach, G. T., J. A. Lawitts, V. E. Papaioannou and J. D. Biggers (1994). "Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media." Biol Reprod**50**(5): 1027-1033.
- Falconer, D. S., R. G. Edwards, R. E. Fowler and R. C. Roberts (1961). "Analysis of differences in the numbers of eggs shed by the two ovaries of mice during natural oestrus or after superovulation." J Reprod Fertil**2**: 418-437.
- Fernandez-Gonzalez, R., P. Moreira, A. Bilbao, A. Jimenez, M. Perez-Crespo, M. A. Ramirez, F. Rodriguez De Fonseca, B. Pintado and A. Gutierrez-Adan (2004). "Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior." Proc Natl Acad Sci U S A**101**(16): 5880-5885.
- Fernandez-Twinn, D. S., S. E. Ozanne, S. Ekizoglou, C. Doherty, L. James, B. Gusterson and C. N. Hales (2003). "The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction." Br J Nutr**90**(4): 815-822.
- Fisher, R. A. (1930). "The Genetical Theory of Natural Selection." Clarendon M. Ridley. Oxford University Press.
- Fisher, R. A. (1930 ). "The Genetical Theory of Natural Selection." Clarendon M. Ridley. Oxford University Press.
- Flint, A. P., S. D. Albon and S. I. Jafar (1997). "Blastocyst development and conceptus sex selection in red deer *Cervus elaphus*: studies of a free-living population on the Isle of Rum." Gen Comp Endocrinol**106**(3): 374-383.
- Folmer, V., J. C. Soares, D. Gabriel and J. B. Rocha (2003). "A high fat diet inhibits delta-aminolevulinatase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*)." J Nutr**133**(7): 2165-2170.
- Fountain, E. D., J. Mao, J. J. Whyte, K. E. Mueller, M. R. Ellersieck, M. J. Will, R. M. Roberts, R. Macdonald and C. S. Rosenfeld (2008). "Effects of diets enriched in omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on offspring sex-ratio and maternal behavior in mice." Biol Reprod**78**(2): 211-217.
- Frank, S. A. (1990). "Sex Allocation Theory for Birds and Mammals." Annual Review of Ecology and Systematics**21**: 13-55.
- Fry, R. C., I. J. Clarke and L. P. Cahill (1987). "Changes in gonadotrophin concentrations are not necessarily involved in ovarian compensation after unilateral ovariectomy in sheep." J Reprod Fertil**79**(1): 45-48.
- Fukuda, M., K. Fukuda, C. Y. Andersen and A. G. Byskov (1996). "Contralateral selection of dominant follicle favours pre-embryo development." Hum Reprod**11**(9): 1958-1962.

- 
- Fukuda, M., K. Fukuda, C. Y. Andersen and A. G. Byskov (2000). "Right-sided ovulation favours pregnancy more than left-sided ovulation." Hum Reprod**15**(9): 1921-1926.
  - Fukuda, M., K. Fukuda, C. Y. Andersen and A. G. Byskov (2006). "Ovulation jumping from the left to the right ovary in two successive cycles may increase the chances of pregnancy during intrauterine insemination and/or in vitro fertilization natural cycles." Fertil Steril**85**(2): 514-517.
  - Fukuda, M., K. Fukuda, T. Shimizu, C. Y. Andersen and A. G. Byskov (2002). "Parental periconceptional smoking and male: female ratio of newborn infants." Lancet**359**(9315): 1407-1408.
  - Fukuda, M., K. Fukuda, T. Shimizu and H. Moller (1998). "Decline in sex ratio at birth after Kobe earthquake." Hum Reprod**13**(8): 2321-2322.
  - Gardner, D. S., K. Tingey, B. W. Van Bon, S. E. Ozanne, V. Wilson, J. Dandrea, D. H. Keisler, T. Stephenson and M. E. Symonds (2005). "Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**289**(4): R947-954.
  - Geiringer, E. (1961). "Effect of ACTH on sex ratio of the albino rat." Proc Soc Exp Biol Med**106**: 752-754.
  - Gibson, M. A. and R. Mace (2003). "Strong mothers bear more sons in rural Ethiopia." Proc Biol Sci**270 Suppl 1**: S108-109.
  - Giritharan, G., S. Talbi, A. Donjacour, F. Di Sebastiano, A. T. Dobson and P. F. Rinaudo (2007). "Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos." Reproduction**134**(1): 63-72.
  - Gougeon, A. and B. Lefevre (1984). "Histological evidence of alternating ovulation in women." J Reprod Fertil**70**(1): 7-13.
  - Grant, V. J. (1994). "Maternal dominance and the conception of sons." Br J Med Psychol**67 ( Pt 4)**: 343-351.
  - Grant, V. J. (1996). "Sex determination and the maternal dominance hypothesis." Hum Reprod**11**(11): 2371-2375.
  - Grant, V. J. and J. T. France (2001). "Dominance and testosterone in women." Biol Psychol**58**(1): 41-47.
  - Grant, V. J. and R. J. Irwin (2005). "Follicular fluid steroid levels and subsequent sex of bovine embryos." J Exp Zool A Comp Exp Biol**303**(12): 1120-1125.
  - Grant, V. J., R. J. Irwin, N. T. Standley, A. N. Shelling and L. W. Chamley (2008). "Sex of bovine embryos may be related to mothers' preovulatory follicular testosterone." Biol Reprod**78**(5): 812-815.
  - Gray, R. H., J. L. Simpson, A. C. Bitto, J. T. Queenan, C. Li, R. T. Kambic, A. Perez, P. Mena, M. Barbato, W. Stevenson and V. Jennings (1998). "Sex ratio associated with timing of insemination and length of the follicular phase in planned and unplanned pregnancies during use of natural family planning." Hum Reprod**13**(5): 1397-1400.

- Grisart, B., A. Massip, L. Collette and F. Dessy (1995). "The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered." Theriogenology**43**(6): 1097-1106.
- Guerrero, R. (1970). "Sex ratio: a statistical association with the type and time of insemination in the menstrual cycle." Int J Fertil**15**(4): 221-225.
- Guidobaldi, H. A., M. E. Teves, D. R. Unates and L. C. Giojalas (2012). "Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement." Reproduction**143**(5): 587-596.
- Gutierrez-Adan, A., G. Perez, J. Granados, J. J. Garde, M. Perez-Guzman, B. Pintado and J. De La Fuente (1999). "Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte." Zygote**7**(1): 37-43.
- Gutierrez-Adan, A., B. Pintado and J. de la Fuente (2000). "Demographic and behavioral determinants of the reduction of male-to-female birth ratio in Spain from 1981 to 1997." Hum Biol**72**(5): 891-898.
- Gutierrez-Adan, A., J. Granados, B. Pintado and J. De La Fuente (2001). "Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro." Reprod Fertil Dev**13**(5-6): 361-365.
- Gutierrez-Adan, A., C. R. White, A. Van Soom and M. R. Mann (2014). "Why we should not select the faster embryo: lessons from mice and cattle." Reprod Fertil Dev.
- Guttenbach, M., W. Engel and M. Schmid (1997). "Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review." Hum Genet**100**(1): 1-21.
- Hahn, T. B., S. Graf, R.Engelmann, M. Beslagic, D. Reul, J. M. H. M. Holsboer, F. Dohr, G. and Desoye, G. (1999). "Placental Glucose Transporter Expression Is Regulated by Glucocorticoids." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**84**(4): 1445-1452.
- Hamilton, W. D. (1967). "Extraordinary sex ratios. A sex-ratio theory for sex linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology." Science**156**(3774): 477-488.
- Hammond, J. (1934). ". The fertilization of rabbit ova in relation to ovulation." J Exp Biol **11**: 140–161.
- Handyside, A. H. and S. Hunter (1984). "A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes." Journal of Experimental Zoology**231**(3): 429-434.
- Harlap, S. (1979). "Gender of infants conceived on different days of the menstrual cycle." N Engl J Med**300**(26): 1445-1448.
- Hedricks, C. and M. K. McClintock (1990). "Timing of insemination is correlated with the secondary sex ratio of Norway rats." Physiol Behav**48**(5): 625-632.

- 
- Helle, S., T. Laaksonen, A. Adamsson, J. Paranko and O. Huitu (2008). "Female field voles with high testosterone and glucose levels produce male-biased litters." *Animal Behaviour***75**(3): 1031-1039.
  - Hess, R. A. and L. Renato de Franca (2008). "Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium." *Adv Exp Med Biol***636**: 1-15.
  - Hewison, A. J. M. G., Jean-Michel (1999). "Successful sons or advantaged daughters? The Trivers–Willard model and sex-biased maternal investment in ungulates." *TREE***14**(6): 229-234.
  - Hiraiwa-Hasegawa, M. (1993). "Skewed birth sex ratios in primates: Should high-ranking mothers have daughters or sons?" *Trends Ecol Evol***8**(11): 395-400.
  - Hod, M., S. Star, J. V. Passonneau, T. G. Unterman and N. Freinkel (1986). "Effect of hyperglycemia on sorbitol and myo-inositol content of cultured rat conceptus: failure of aldose reductase inhibitors to modify myo-inositol depletion and dysmorphogenesis." *Biochem Biophys Res Commun***140**(3): 974-980.
  - Hollander, W. F. (1950). Intra-uterine mortality and placental fusions in the mouse. S. LC, Journal of Experimental Zoology. **115**: 131-149.
  - Holm, P., N. N. Shukri, G. Vajta, P. Booth, C. Bendixen and H. Callesen (1998). "Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex." *Theriogenology***50**(8): 1285-1299.
  - Hovatta, O., I. Reima, T. Foudila, T. Butzow, K. Johansson and K. von Smitten (1996). "Vas deferens aspiration and intracytoplasmic injection of frozen-thawed spermatozoa in a case of anejaculation in a diabetic man." *Hum Reprod***11**(2): 334-335.
  - Hunter, J. (1787). An experiment to determine the effect of extirpating one ovarium upon the number of young produced, *Phil. Trans. R. Soc.* **77**: 233.
  - Hylan, D., A. M. Giraldo, J. A. Carter, G. T. Gentry, Jr., K. R. Bondioli and R. A. Godke (2009). "Sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries." *Biol Reprod***81**(5): 933-938.
  - Iwasaki, S., Y. Shioya, H. Masuda, A. Hanada and T. Nakahara (1988). "Sex ratio of early embryos fertilized in vitro with spermatozoa separated by percoll." *Theriogenology***30**(6): 1191-1198.
  - James, W. H. (1980). "Gonadotrophin and the human secondary sex ratio." *Br Med J***281**(6242): 711-712.
  - James, W. H. (1980). "Time of fertilisation and sex of infants." *Lancet***1**(8178): 1124-1126.
  - James, W. H. (1985). "Sex ratio, dominance status and maternal hormone levels at the time of conception." *J Theor Biol***114**(3): 505-510.
  - James, W. H. (1986). "Hormonal control of sex ratio." *J Theor Biol***118**(4): 427-441.
  - James, W. H. (1990). "The hypothesized hormonal control of human sex ratio at birth--an update." *J Theor Biol***143**(4): 555-564.

- James, W. H. (1990). "The sex ratios of offspring of sexually promiscuous people: with reference to hepatitis B and prostatic cancer. A comment." J Biosoc Sci**22**(4): 517-518.
- James, W. H. (1992). "The hypothesized hormonal control of mammalian sex ratio at birth--a second update." J Theor Biol**155**(1): 121-128.
- James, W. H. (1994). "Sex ratios of the offspring of patients with multiple sclerosis." Neuroepidemiology**13**(5): 216-219.
- James, W. H. (1995). "Follicular phase length, cycle day of conception and sex ratio of offspring." Hum Reprod**10**(10): 2529-2531.
- James, W. H. (1995). "Sex ratios of offspring and the causes of placental pathology." Hum Reprod**10**(6): 1403-1406.
- James, W. H. (1996). "Evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels at the time of conception." J Theor Biol**180**(4): 271-286.
- James, W. H. (1996). "Genetic and non-genetic determinants of the human sex ratio at birth." Hum Reprod**11**(5): 939-940.
- James, W. H. (1996). "Male reproductive hazards and occupation." The Lancet**347**(9003).
- James, W. H. (2001). "Side of ovulation, hormones and sex ratios." Hum Reprod**16**(1): 198.
- James, W. H. (2004). "Hypotheses on how selection for some traits in rodents led to correlated responses in offspring sex ratios." Journal of Theoretical Biology**228**: 1-6.
- James, W. H. (2008). "Evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels around the time of conception." J Endocrinol**198**(1): 3-15.
- Jauniaux, E., J. Hempstock, C. Teng, F. C. Battaglia and G. J. Burton (2005). "Polyol concentrations in the fluid compartments of the human conceptus during the first trimester of pregnancy: maintenance of redox potential in a low oxygen environment." J Clin Endocrinol Metab**90**(2): 1171-1175.
- Jimenez A, G.-A. A., de la Fuentes R, Pintado B (2001). "Relationship between time to synchrony of embryo transfer and sex ratio on mice." Theriogenology**55**(500): (abstract).
- Johnson, L. A., J. Flook and H. Hawk (1989). "Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting." Biology of Reproduction**41**(2): 199-203.
- Johnson, L. A. (2000). "Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art." Anim Reprod Sci**60-61**: 93-107.
- Johnson, S. K., M. F. Smith and R. G. Elmore (1985). "Effect of unilateral ovariectomy and injection of bovine follicular fluid on gonadotropin secretion and compensatory ovarian hypertrophy in prepuberal heifers." J Anim Sci**60**(4): 1055-1060.

- 
- Juntunen, K. S., A. P. Kvist and A. J. Kauppila (1997). "A shift from a male to a female majority in newborns with the increasing age of grand grand multiparous women." Hum Reprod**12**(10): 2321-2323.
  - Kaaja, R. J. (2008). "Metabolic syndrome and the menopause." Menopause Int**14**(1): 21-25.
  - Kaminski, M. A., S. P. Ford, C. R. Youngs and A. J. Conley (1996). "Lack of effect of sex on pig embryonic development in vivo." J Reprod Fertil**106**(1): 107-110.
  - Kaser, D. J. and C. Racowsky (2014). Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. Hum Reprod Update, (c) The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com. **20**: 617-631.
  - Katila, T. (2001). "Sperm-uterine interactions: a review." Anim Reprod Sci**68**(3-4): 267-272.
  - Kent, J. P. (1992 ). "Birth sex ratios in sheep over six lambing seasons." Behavioral Ecology and Sociobiology**30**(3): 151-155.
  - Khong, T. Y. (1998). "Pregnancies Complicated by Retained Placenta: Sex Ratio and Relation to Pre-eclampsia." placenta**19**: 577-580.
  - Houry, M. J., J. D. Erickson and L. M. James (1984). "Paternal effects on the human sex ratio at birth: evidence from interracial crosses." Am J Hum Genet**36**(5): 1103-1111.
  - Kimura, K., L. D. Spate, M. P. Green and R. M. Roberts (2004). "Effects of oxidative stress and inhibitors of the pentose phosphate pathway on sexually dimorphic production of IFN-tau by bovine blastocysts." Mol Reprod Dev**68**(1): 88-95.
  - Kobayashi, S., A. Isotani, N. Mise, M. Yamamoto, Y. Fujihara, K. Kaseda, T. Nakanishi, M. Ikawa, H. Hamada, K. Abe and M. Okabe (2006). "Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, RhoX5/Pem, at preimplantation stages." Curr Biol**16**(2): 166-172.
  - Kochhar, H. S., K. P. Kochhar, P. K. Basrur and W. A. King (2003). "Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos." Anim Reprod Sci**77**(1-2): 33-49.
  - Kojola, I. E., Eija (1989). "Influences of Maternal Body Weight, Age, and Parity on Sex Ratio in Semidomesticated Reindeer (*Rangifer T. tarandus*)." Evolution**43**(6): 1331-1336
  - Krackow, S. (1997). "Effects of mating dynamics and crowding on sex ratio variance in mice." J Reprod Fertil**110**(1): 87-90.

- Kruuk, L. E., T. H. Clutton-Brock, S. D. Albon, J. M. Pemberton and F. E. Guinness (1999). "Population density affects sex ratio variation in red deer." Nature**399**(6735): 459-461.
- Kwong, W. Y. W., Arthur E. Roberts, Paul. Willis, Antony C. Fleming, Tom P. (2000). "Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension." Development**127**: 4195-4202.
- Laguna-Barraza, R., P. Bermejo-Álvarez, P. Ramos-Ibeas, C. de Frutos, A. P. López-Cardona, A. Calle, R. Fernandez-Gonzalez, E. Pericuesta, M. A. Ramírez and A. Gutierrez-Adan (2012). "Sex-specific embryonic origin of postnatal phenotypic variability." Reprod Fertil Dev**25**(1): 38-47.
- Lane, E. A. H., Thomas S. (1973). "Effect of maternal stress on fertility and sex ratio: A pilot study with rats." Journal of Abnormal Psychology **82**(1).
- Larson, M. A., K. Kimura, H. M. Kubisch and R. M. Roberts (2001). "Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau." Proc Natl Acad Sci U S A**98**(17): 9677-9682.
- Le Bœuf, B. J. C., Richard. Reiter, Joanne (1989). "1989." 1989**25**(2): 109-117
- Lechniak, D., T. Strabel, D. Bousquet and A. W. King (2003). "Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced in vitro." Reprod Domest Anim**38**(3): 224-227.
- Levin, M. (2005). "Left–right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review." Mechanisms of development**122**(1): 3-25.
- Lonergan, P., H. Khatir, F. Piumi, D. Rieger, P. Humblot and M. P. Boland (1999). "Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos." J Reprod Fertil**117**(1): 159-167.
- Lummaa, V. M., Juha.Kause, Antti. (1998). "Adaptive sex ratio variation in pre-industrial human (Homo sapiens) populations?" Proc. R. Soc. Lond. B(265): 563-568.
- Machado, A. F., E. F. Zimmerman, D. N. Hovland, Jr., R. Weiss and M. D. Collins (2001). "Diabetic embryopathy in C57BL/6J mice. Altered fetal sex ratio and impact of the splotch allele." Diabetes**50**(5): 1193-1199.
- Maciel, S. M., C. S. Chamberlain, R. P. Wettemann and L. J. Spicer (2001). "Dexamethasone influences endocrine and ovarian function in dairy cattle." J Dairy Sci**84**(9): 1998-2009.
- Macmahon, B. and T. F. Pugh (1954). "Sex ratio of white births in the United States during the Second World War." Am J Hum Genet**6**(2): 284-292.
- Madrid-Bury, N., R. Fernandez, A. Jimenez, S. Perez-Garnelo, P. N. Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente and A. Gutierrez-Adan (2003). "Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio." Zygote**11**(3): 229-235.

- 
- Magli, M. C., L. Gianaroli, S. Munne and A. P. Ferraretti (1998). "Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients." J Assist Reprod Genet**15**(5): 297-301.
  - Maher, E. R., L. A. Brueton, S. C. Bowdin, A. Luharia, W. Cooper, T. R. Cole, F. Macdonald, J. R. Sampson, C. L. Barratt, W. Reik and M. M. Hawkins (2003). "Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)." J Med Genet**40**(1): 62-64.
  - Mallampati, R. S. and L. E. Casida (1970). "Ovarian compensatory hypertrophy following unilateral ovariectomy during the breeding season in the ewe." Biol Reprod**3**(1): 43-46.
  - Mann, M. R., S. S. Lee, A. S. Doherty, R. I. Verona, L. D. Nolen, R. M. Schultz and M. S. Bartolomei (2004). "Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture." Development**131**(15): 3727-3735.
  - Market Velker, B. A., M. M. Denomme and M. R. Mann (2012). "Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation." Biol Reprod**86**(5): 143, 141-116.
  - Market-Velker, B. A., A. D. Fernandes and M. R. Mann (2010). "Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance." Biol Reprod**83**(6): 938-950.
  - Martin, J. F. (1997). "Length of the follicular phase, time of insemination, coital rate and the sex of offspring." Hum Reprod**12**(3): 611-616.
  - Mazur, A. (1976). "Effects of testosterone on status in primate groups." Folia Primatol (Basel)**26**(3): 214-226.
  - McEvoy, J. (1992). Alteration of the sex ratio, *Anim Breed Abstr.* **60**: 97-111.
  - McLaren, A. (1963). "The distribution of eggs and embryos between sides in the mouse." J Endocrinol**27**: 157-181.
  - McMillen, I. C. and J. S. Robinson (2005). "Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming." Physiol Rev**85**(2): 571-633.
  - Meikle, D. B. and L. C. Drickamer (1986). "Food availability and secondary sex ratio variation in wild and laboratory house mice (*Mus musculus*)." J Reprod Fertil**78**(2): 587-591.
  - Meikle, D. B. D., Lee C. Vessey, Stephen H. Rosenthal, Thomas L. (1993). "Maternal dominance rank and secondary sex ratio in domestic swine." Animal Behaviour**46**(1): 79-85.
  - Meikle, D. B. (1995). "Adult male house mice born to undernourished mothers are unattractive to oestrous females." Animal Behaviour**50**: 753-758.
  - Meikle, D. B. and M. W. Thornton (1995). "Premating and gestational effects of maternal nutrition on secondary sex ratio in house mice." J Reprod Fertil**105**(2): 193-196.

- Meikle, D. D., LC. Vessey, SH. Arthur, RD. Rosenthal, TL (1996). "Dominance rank and parental investment in swine (*Sus scrofa domesticus*)." Ethology **102**: 969–978.
- Meikle, D. and M. Westberg (2001). "Maternal nutrition and reproduction of daughters in wild house mice (*Mus musculus*)." Reproduction**122**(3): 437-442.
- Mi, J., C. Law, K. L. Zhang, C. Osmond, C. Stein and D. Barker (2000). "Effects of infant birthweight and maternal body mass index in pregnancy on components of the insulin resistance syndrome in China." Ann Intern Med**132**(4): 253-260.
- Miao, D. Q., B. Liang, J. Z. Wang, H. L. Wang, W. Cui, Y. Liu and J. H. Tan (2009). "Fertilization in vitro with spermatozoa from different mice increased variation in the developmental potential of embryos compared to artificial parthenogenetic activation." Mol Reprod Dev**76**(3): 239-245.
- Mitra, J. and M. Chowdhury (1989). "Glycerolphosphorylcholine diesterase activity of uterine fluid in conditions inducing secondary sex ratio change in the rat." Gamete Res**23**(4): 415-420.
- Mittwoch, U. (1989). "Sex differentiation in mammals and tempo of growth: probabilities vs. switches." J Theor Biol**137**(4): 445-455.
- Moley, K. H., M. M. Chi, C. M. Knudson, S. J. Korsmeyer and M. M. Mueckler (1998). "Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways." Nat Med**4**(12): 1421-1424.
- Moriya, K. and T. Hiroshige (1978). "Sex ratio of offsprings of rats bred at 5 degrees C." Int J Biometeorol**22**(4): 312-315.
- Mortensen, J. T., A. M. Thulstrup, H. Larsen, M. Moller and H. T. Sorensen (2001). "Smoking, sex of the offspring, and risk of placental abruption, placenta previa, and preeclampsia: a population-based cohort study." Acta Obstet Gynecol Scand**80**(10): 894-898.
- Mouridsen, S. E. and K. M. Hauschild (2010). "The sex ratio of siblings of individuals with a history of developmental language disorder." Logoped Phoniatr Vocol**35**(3): 144-148.
- Mouridsen, S. E., B. Rich and T. Isager (2013). "The Sex Ratio of Full and Half Siblings of People Diagnosed with an Autism Spectrum Disorder: A Danish Nationwide Register Study." Child Psychiatry Hum Dev.
- Mueller, B. R. and T. L. Bale (2008). "Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy." J Neurosci**28**(36): 9055-9065.
- Munne, S., Y. X. Tang, H. U. Weier, J. Stein, M. Finkelstein, J. Grifo and J. Cohen (1993). "Sex distribution in arrested precompacted human embryos." Zygote**1**(2): 155-162.
- Nakanishi, T., A. Kuroiwa, S. Yamada, A. Isotani, A. Yamashita, A. Tairaka, T. Hayashi, T. Takagi, M. Ikawa, Y. Matsuda and M. Okabe (2002). "FISH analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome." Genomics**80**(6): 564-574.

- 
- Navin, A., R. Prekeris, N. A. Lisitsyn, M. M. Sonti, D. A. Grieco, S. Narayanswami, E. S. Lander and E. M. Simpson (1996). "Mouse Y-specific repeats isolated by whole chromosome representational difference analysis." Genomics**36**(2): 349-353.
  - Nedambale, T. L., A. Dinnyes, X. Yang and X. C. Tian (2004). "Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification." Biol Reprod**71**(5): 1671-1676.
  - Ng, E., P. Claman, M. C. Leveille, N. Tanphaichitr, K. Compitak, S. Suwajanakorn and G. Wells (1995). "Sex ratio of babies is unchanged after transfer of fast- versus slow-cleaving embryos." J Assist Reprod Genet**12**(9): 566-568.
  - Nicholls, R. D. and J. L. Knepper (2001). "Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes." Annu Rev Genomics Hum Genet**2**: 153-175.
  - Nicolich, M. J. H., Wendy W. Schnatter, A. Robert . (2000). "Influence of parental and biological factors on the male birth fraction in the United States: an analysis of birth certificate data from 1964 through 1988." Fertility and Sterility**73**(3): 487-492.
  - Nonaka, K., B. Desjardins, H. Charbonneau, J. Legare and T. Miura (1999). "Human sex ratio at birth and mother's birth season: multivariate analysis." Hum Biol**71**(5): 875-884.
  - Novitski, E. (1953). "The dependence of the secondary sex ratio in humans on the age of the father." Science**117**(3046): 531-533.
  - O, W. S. and P. H. Chow (1987). "Asymmetry in the ovary and uterus of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*)." J Reprod Fertil**80**(1): 21-23.
  - Olsson, H. and L. Brandt (1982). "Sex ratio in offspring of patients with non-Hodgkin lymphoma." N Engl J Med**306**(6): 367-368.
  - Papa, F., R. Henrion and G. Breart (1983). "[Preconceptional selection of sex using the ionic method. Dietary regime. Results of a 2 years' prospective clinical study]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)**12**(4): 415-422.
  - Parazzini, F., L. Chatenoud, C. Maffioletti, F. Chiaffarino and D. Caserta (2005). "Periconceptional smoking and male:female ratio of newborns." Eur J Public Health**15**(6): 613-614.
  - Peaker, M. and E. Taylor (1996). "Sex ratio and litter size in the guinea-pig." J Reprod Fertil**108**(1): 63-67.
  - Pegoraro L, R. M., Deschamps JC, Dellagostin OA, Pimentel AM, Bernardi ML, Saalfeld MH (2002). Percoll gradient versus swim-up: effect of sperm preparation method on sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos, Theriogenology, abstract. **57**: 751.
  - Pegoraro, L. M., J. M. Thuard, N. Delalleau, B. Guerin, J. C. Deschamps, B. Marquant Le Guienne and P. Humblot (1998). "Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with Vero cells." Theriogenology**49**(8): 1579-1590.

- Peippo, J. and P. Bredbacka (1995). "Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro." Mol Reprod Dev**40**(1): 56-61.
- Peippo, J. B., P. (1999). "Male bovine zygotes cleave earlier than female zygotes in the presence of glucose." Theriogenology**45**(1): 187.
- Penfold, L. M., C. Holt, W. V. Holt, G. R. Welch, D. G. Cran and L. A. Johnson (1998). "Comparative motility of X and Y chromosome-bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting." Mol Reprod Dev**50**(3): 323-327.
- Pepler, R. D. (1971). "Effects of unilateral ovariectomy on follicular development and ovulation in cycling, aged rats." Am J Anat**132**(4): 423-427.
- Perez-Crespo, M., B. Pintado and A. Gutierrez-Adan (2008). "Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice." Mol Reprod Dev**75**(1): 40-47.
- Perez-Crespo, M., M. A. Ramirez, R. Fernandez-Gonzalez, D. Rizo, P. Lonergan, B. Pintado and A. Gutierrez-Adan (2005). "Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression." Mol Reprod Dev**72**(4): 502-510.
- Pergament, E., M. Fiddler, N. Cho, D. Johnson and W. J. Holmgren (1994). "Sexual differentiation and preimplantation cell growth." Hum Reprod**9**(9): 1730-1732.
- Perret, M. (1990). "Influence of Social Factors on Sex Ratio at Birth, Maternal Investment and Young Survival in a Prosimian Primate." Behavioral Ecology and Sociobiology**27**(6): 447-454.
- Phuge, S. K. and N. P. Gramapurohit (2014). "Sex hormones alter sex ratios in the Indian skipper frog, *Euphyctis cyanophlyctis*: Determining sensitive stages for gonadal sex reversal." Gen Comp Endocrinol.
- Pomerol Monseny, J. M., F. García José, P. Nolasco Barri, A. Veiga Lluçh, G. Calderón de Oya, N. Parera Junyent, B. V. Coroleu Lletget and B. Aran Corbella (1993). "[Pregnancy via spermatozoa aspirated from the ductus deferens and fertilization in vitro]." Arch Esp Urol**46**(9): 811-815.
- Pomp, D., B. A. Good, R. D. Geisert, C. J. Corbin and A. J. Conley (1995). "Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos." J Anim Sci**73**(5): 1408-1415.
- Potashnik, G., V. Insler, I. Meizner and M. Sternberg (1987). "Frequency, sequence, and side of ovulation in women menstruating normally." Br Med J (Clin Res Ed)**294**(6566): 219.
- Pratt, N. C., U. W. Huck and R. D. Lisk (1987). "Offspring sex ratio in hamsters is correlated with vaginal pH at certain times of mating." Behav Neural Biol**48**(2): 310-316.

- 
- Pratt, N. C. and R. D. Lisk (1989). "Effects of social stress during early pregnancy on litter size and sex ratio in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*)."  
J Reprod Fertil**87**(2): 763-769.
  - Pratt, N. C. and R. D. Lisk (1990). "Dexamethasone can prevent stress-related litter deficits in the golden hamster."  
Behav Neural Biol**54**(1): 1-12.
  - Pratt, N. C. and R. D. Lisk (1991). "Role of progesterone in mediating stress-related litter deficits in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*)."  
J Reprod Fertil**92**(1): 139-146.
  - Ravelli, A. C., J. H. van der Meulen, R. P. Michels, C. Osmond, D. J. Barker, C. N. Hales and O. P. Bleker (1998). "Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine."  
Lancet**351**(9097): 173-177.
  - Raz, T., R. Avni, Y. Addadi, Y. Cohen, A. J. Jaffa, B. Hemmings, J. R. Garbow and M. Neeman (2012). "The hemodynamic basis for positional- and inter-fetal dependent effects in dual arterial supply of mouse pregnancies."  
PLoS One**7**(12): e52273.
  - Reimers, T. J., P. J. Dziuk, J. Bahr, D. J. Sprecher, S. K. Webel and B. G. Harmon (1973). "Transuterine embryonal migration in sheep, anteroposterior orientation of pig and sheep fetuses and presentation of piglets at birth."  
J Anim Sci**37**(5): 1212-1217.
  - Riboni, L. (2002). "Effects of guanethidine administration on compensatory ovarian hypertrophy, compensatory ovulation and follicular development in the prepubertal female guinea pig."  
Gen Comp Endocrinol**127**(3): 279-284.
  - Rivers, J. C., Ma. (1974). "Maternal nutrition and the sex ratio at birth."  
nature**252**: 297 - 298.
  - Rizos, D., M. Clemente, P. Bermejo-Alvarez, J. de La Fuente, P. Lonergan and A. Gutiérrez-Adán (2008). "Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality."  
Reproduction in domestic animals**43**(s4): 44-50.
  - Rjasanowski, I., I. Kloting and P. Kovacs (1998). "Altered sex ratio in offspring of mothers with insulin-dependent diabetes mellitus."  
Lancet**351**(9101): 497-498.
  - Roche, J. R., J. M. Lee and D. P. Berry (2006). "Pre-conception energy balance and secondary sex ratio--partial support for the Trivers-Willard hypothesis in dairy cows."  
J Dairy Sci**89**(6): 2119-2125.
  - Rorie, R. W. (1999). "Effect of timing of artificial insemination on sex ratio."  
Theriogenology**52**(8): 1273-1280.
  - Rose, R. M., I. S. Berstein and T. P. Gordon (1975). "Consequences of social conflict on plasma testosterone levels in rhesus monkeys."  
Psychosom Med**37**(1): 50-61.
  - Rosenfeld, C. S., K. M. Grimm, K. A. Livingston, A. M. Brokman, W. E. Lamberson and R. M. Roberts (2003). "Striking variation in the sex ratio of pups born to mice according to whether maternal diet is high in fat or carbohydrate."  
Proc Natl Acad Sci U S A**100**(8): 4628-4632.

- Rosenfeld, C. S. and R. M. Roberts (2004). "Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review." Biol Reprod**71**(4): 1063-1070.
- Roxborough, H. E., G. W. Burton and F. J. Kelly (2000). "Inter- and intra-individual variation in plasma and red blood cell vitamin E after supplementation." Free Radic Res**33**(4): 437-445.
- Ruder, A. (1985). "Paternal-Age and Birth-Order Effect on the Human Secondary Sex Ratio." Am J Hum Genet(37): 362-372.
- Rueness, J., L. Vatten and A. Eskild (2012). "The human sex ratio: effects of maternal age."
- Sakai, N. and A. Endo (1987). "Effects of induced ovulation by pregnant mare's serum and human chorionic gonadotropin on the sex ratio of mouse fetuses." Gamete Res**16**(4): 319-322.
- Saling, P. M. (1991). "How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies." Biol Reprod**44**(2): 246-251.
- Schlager, G. R., T. (1968). "Secondary Sex Ratio in Mice." J. Hered.**59**: 363–365.
- Seidel, G. E., Jr. (2003). "Economics of selecting for sex: the most important genetic trait." Theriogenology**59**(2): 585-598.
- Sheldon, B. C. W., Stuart A. (2004). "Maternal Dominance, Maternal Condition, and Offspring Sex Ratio in Ungulate Mammals." The American Naturalist**163**(1): 40-54.
- Sheldon, B. C. W., Stuart A. (2004). "Maternal Dominance, Maternal Condition, and Offspring Sex Ratio in Ungulate Mammals." The American Naturalist**163**(1): 40-54
- Shettles, L. B. (1970). "Factors influencing sex ratios." International Journal of Gynecology and Obstetrics**8**(5): 643-647.
- Simonetta, G., D. W. Walker and I. C. McMillen (1991). "Effect of feeding on the diurnal rhythm of plasma cortisol and adrenocorticotrophic hormone concentrations in the pregnant ewe and sheep fetus." Exp Physiol**76**(2): 219-229.
- Singh, D. and R. J. Zambarano (1997). "Offspring sex ratio in women with android body fat distribution." Hum Biol**69**(4): 545-556.
- Sipilä, P., T. G. Cooper, C. H. Yeung, M. Mustonen, J. Penttinen, J. Drevet, I. Huhtaniemi and M. Poutanen (2002). "Epididymal dysfunction initiated by the expression of simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice." Mol Endocrinol**16**(11): 2603-2617.
- Skogland, T. (1986). "sex ratio variation in relation to maternal condition and parental investment in wild reindeer *Rangifer t. tarandus*." OIKOS**46**(3): 417-419.
- Stringfellow, D. and M. Givens (1990). Manual of the International Embryo Transfer Society (Version 5 edition)International Embryo Transfer Society. Champaign IL: 41-45.
- Suarez, S. and A. Pacey (2006). "Sperm transport in the female reproductive tract." Human Reproduction Update**12**(1): 23-37.

- 
- Summers, M. C. (2013). "A brief history of the development of the KSOM family of media." *J Assist Reprod Genet***30**(8): 995-999.
  - Symonds, M. E., T. Stephenson, D. S. Gardner and H. Budge (2007). "Long-term effects of nutritional programming of the embryo and fetus: mechanisms and critical windows." *Reprod Fertil Dev***19**(1): 53-63.
  - Szenczi, P., O. Banszegi, Z. Groo and V. Altbacker (2013). "Anogenital distance and condition as predictors of litter sex ratio in two mouse species: a study of the house mouse (*Mus musculus*) and mound-building mouse (*Mus spicilegus*)." *PLoS One***8**(9): e74066.
  - Takano, K., T. Tanimura and H. Nishimura (1965). "The susceptibility of the offspring of alloxandiabetic mice to a teratogen." *J Embryol Exp Morphol***14**(1): 63-73.
  - Tamimi, R. M., P. Lagiou, L. A. Mucci, C. C. Hsieh, H. O. Adami and D. Trichopoulos (2003). "Average energy intake among pregnant women carrying a boy compared with a girl." *BMJ***326**(7401): 1245-1246.
  - Tarin, J. J., R. Bernabeu, A. Baviera, M. Bonada and A. Cano (1995). "Sex selection may be inadvertently performed in in-vitro fertilization-embryo transfer programmes." *Hum Reprod***10**(11): 2992-2998.
  - Tarin, J. J., M. A. Garcia-Perez, C. Hermenegildo and A. Cano (2014). "Changes in sex ratio from fertilization to birth in assisted-reproductive-treatment cycles." *Reprod Biol Endocrinol***12**: 56.
  - Thatcher, S. S., U. Restrepo, G. Lavy and A. H. DeCherney (1989). In-vitro fertilisation and sex ratio. *Lancet*. England. **1**: 1025-1026.
  - Thomson, A. J., M. R. Gazvani, S. J. Wood, S. C. Meacock, D. I. Lewis-Jones and C. R. Kingsland (2001). "Comparison of ovarian response in right and left ovaries in IVF patients." *Hum Reprod***16**(8): 1694-1697.
  - Thonneau, P., L. Bujan, L. Multigner and R. Mieusset (1998). "Occupational heat exposure and male fertility: a review." *Hum Reprod***13**(8): 2122-2125.
  - Til, H. P. F., V.J. de Groot, A.P. (1971). "The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats." *Food and Cosmetics Toxicology***10**(3): 291-310.
  - Trivers, R. L. and D. E. Willard (1973). "Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring." *Science***179**(4068): 90-92.
  - Trujillo, A., L. Morales, X. Vargas, L. Alba and R. Domínguez (2004). "Effects of capsaicin treatment on the regulation of ovarian compensatory hypertrophy and compensatory ovulation." *Endocrine***25**(2): 155-162.
  - Tse, W. Y., S. C. Town, G. K. Murdoch, S. Novak, M. K. Dyck, C. T. Putman, G. R. Foxcroft and W. T. Dixon (2008). "Uterine crowding in the sow affects litter sex ratio, placental development and embryonic myogenin expression in early gestation." *Reprod Fertil Dev***20**(4): 497-504.
  - Tsunoda, Y. T., T. Sugie, T (2005). "Altered sex ratio of live young after transfer of fast- and slow-developing mouse embryos." *Gamete Research***12**(3): 301-304.

- Uller, T. M., S. De Fraipont, M. Clobert, J. (2005). "Is sexual dimorphism affected by the combined action of prenatal stress and sex ratio? ." Exp Zoolog A Comp Exp Biol **303**: 1110–1114.
- Valdivia, R. P., T. Kunieda, S. Azuma and Y. Toyoda (1993). "PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured in vitro." Mol Reprod Dev**35**(2): 121-126.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A. M., B. J. Aerts and J. H. den Daas (1998). "Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study." Theriogenology**49**(5): 883-894.
- Vandenberg, J. G. and C. L. Huggett (1994). "Mother's prior intrauterine position affects the sex ratio of her offspring in house mice." Proc Natl Acad Sci U S A**91**(23): 11055-11059.
- Vatten, L. J. and R. Skjaerven (2004). "Offspring sex and pregnancy outcome by length of gestation." Early Hum Dev**76**(1): 47-54.
- Vesela, J., P. Rehak, V. Baran and J. Koppel (1994). "Effects of healthy pseudopregnant milieu on development of two-cell subdiabetic mouse embryos." Journal of reproduction and fertility**100**(2): 561-565.
- Vickers, A. D. (1969). "Delayed fertilization and the prenatal sex-ratio of the mouse." J Reprod Fertil**20**(1): 63-68.
- Vom Saal, F. C., M. Galef, B. Drickamer, L. Vandenberg, J. (1999). "The intrauterine position (IUP) phenomenon." In: Neill EEKJ (ed.), Encyclopedia of Reproduction. New York: Academic Press: 893-900.
- Vom Saal, F. C., M. Galef, B. Drickamer, L. Vandenberg, J. (1999). "The intrauterine position (IUP) phenomenon. ." In: Neill EEKJ (ed.), Encyclopedia of Reproduction. New York: Academic Press: 893-900.
- Wade, M. J., S. M. Shuster and J. P. Demuth (2003). "Sexual selection favors female-biased sex ratios: the balance between the opposing forces of sex-ratio selection and sexual selection." Am Nat**162**(4): 403-414.
- Wallach, E. E., P. Virutamasen and K. H. Wright (1973). "Menstrual cycle characteristics and side of ovulation in the Rhesus monkey." Fertil Steril**24**(9): 715-721.
- Wallner, B., M. Fieder and H. Seidler (2012). "Ownership of dwelling affects the sex ratio at birth in Uganda." PloS one**7**(12): e51463.
- Wang, H., S. Tranguch, H. Xie, G. Hanley, S. K. Das and S. K. Dey (2005). "Variation in commercial rodent diets induces disparate molecular and physiological changes in the mouse uterus." Proc Natl Acad Sci U S A**102**(28): 9960-9965.
- Waterland, R. A., D. C. Dolinoy, J. R. Lin, C. A. Smith, X. Shi and K. G. Tahiliani (2006). "Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused." Genesis**44**(9): 401-406.
- Watson, E. D., E. Nikolakopoulos, C. Gilbert and J. Goode (1999). "Oxytocin in the semen and gonads of the stallion." Theriogenology**51**(4): 855-865.

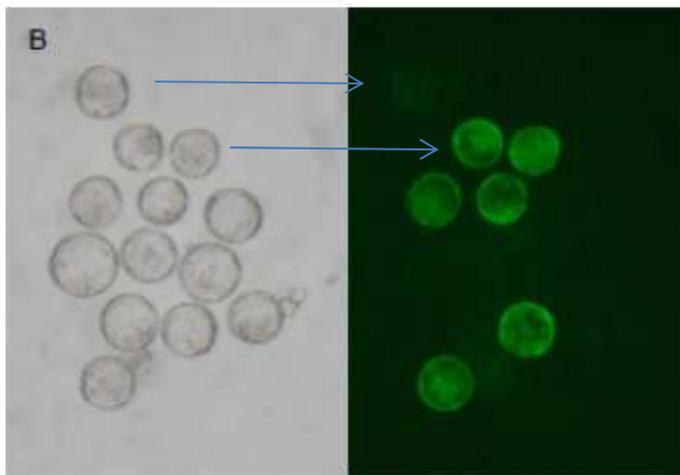
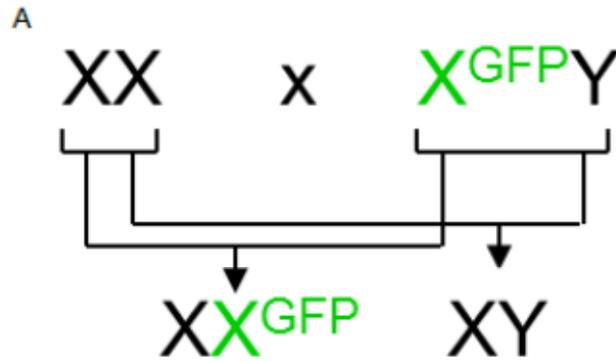
- 
- Wauters, L. A. d. C., Simon A. Nour, Nadia. Matthysen, Erik (1995). "Do Female Roe Deer in Good Condition Produce More Sons than Daughters." Behavioral Ecology and Sociobiology **37**(3): 189-193
  - Weathersbee, P. S., R. L. Ax and J. R. Lodge (1975). "Caffeine-mediated changes of sex ratio in Chinese hamsters, *Cricetulus griseus*." J Reprod Fertil **43**(1): 141-143.
  - Wei, Z. T., X. L. Lu, G. Zhang, J. Yu, H. Li, G. H. Jia, J. T. Li and J. M. Zhang (2014). "The long-term effects of superovulation on fertility and sexual behavior of male offspring in mice." J Assist Reprod Genet **31**(5): 555-560.
  - Weinberg, C. R., D. D. Baird and A. J. Wilcox (1995). "The sex of the baby may be related to the length of the follicular phase in the conception cycle." Hum Reprod **10**(2): 304-307.
  - Wells, J. C. (2000). "Natural selection and sex differences in morbidity and mortality in early life." J Theor Biol **202**(1): 65-76.
  - Werlin, L. B., L. Weckstein, P. S. Weathersbee, K. Parenicka, D. White and S. C. Stone (1986). "Ultrasound: a technique useful in determining the side of ovulation." Fertil Steril **46**(5): 814-817.
  - West, S. A., S. E. Reece and B. C. Sheldon (2002). "Sex ratios." Heredity (Edinb) **88**(2): 117-124.
  - West, S. A., D. M. Shuker and B. C. Sheldon (2005). "Sex-ratio adjustment when relatives interact: a test of constraints on adaptation." Evolution **59**(6): 1211-1228.
  - Whyte, J. J., A. P. Alexenko, A. M. Davis, M. R. Ellersieck, E. D. Fountain and C. S. Rosenfeld (2007). "Maternal diet composition alters serum steroid and free fatty acid concentrations and vaginal pH in mice." J Endocrinol **192**(1): 75-81.
  - Wiebold, J. L. and W. C. Becker (1987). "Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the mouse." J Reprod Fertil **79**(1): 125-134.
  - Williams, R. J. and S. P. Gloster (1992). "Human sex ratio as it relates to caloric availability." Soc Biol **39**(3-4): 285-291.
  - Wilmut, I., D. Sales and C. Ashworth (1986). "Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals." Journal of Reproduction and Fertility **76**(2): 851-864.
  - Wimsatt, W. A. (1975). "Some Comparative Aspects of Implantation." Biology of Reproduction **12**: 1-40.
  - Wise, T. H. and R. K. Christenson (1992). "Relationship of fetal position within the uterus to fetal weight, placental weight, testosterone, estrogens, and thymosin beta 4 concentrations at 70 and 104 days of gestation in swine." J Anim Sci **70**(9): 2787-2793.
  - Wolf CA, B. K., Rubin MIB, Pozzobon SE, Mozzaquatro FD, De La Corte FD. (2008). The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. **5**: 5.
  - Wong, C. C., K. E. Loewke, N. L. Bossert, B. Behr, C. J. De Jonge, T. M. Baer and R. A. Reijo Pera (2010). "Non-invasive imaging of human embryos before

- embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage." Nat Biotechnol**28**(10): 1115-1121.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann and H. Niemann (2007). "Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability." Theriogenology**68**: S77-S83.
  - Xu, K. P., B. R. Yadav, W. A. King and K. J. Betteridge (1992). "Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro." Mol Reprod Dev**31**(4): 249-252.
  - Yadav, B. R., W. A. King and K. J. Betteridge (1993). "Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro." Mol Reprod Dev**36**(4): 434-439.
  - Yamanaka, H. S. and A. L. Soderwall (1960). "Transport of spermatozoa through the female genital tract of hamsters." Fertil Steril**11**: 470-474.
  - Yan, J., H. L. Feng, Z. J. Chen, J. Hu, X. Gao and Y. Qin (2006). "Influence of swim-up time on the ratio of X- and Y-bearing spermatozoa." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**129**(2): 150-154.
  - Yeung, C. H., M. Anapolski, P. Sipilä, A. Wagenfeld, M. Poutanen, I. Huhtaniemi, E. Nieschlag and T. G. Cooper (2002). "Sperm volume regulation: maturational changes in fertile and infertile transgenic mice and association with kinematics and tail angulation." Biol Reprod**67**(1): 269-275.
  - Zamiri, M. J. (1978). "Effects of reduced food intake on reproduction in mice." Aust J Biol Sci**31**(6): 629-639.

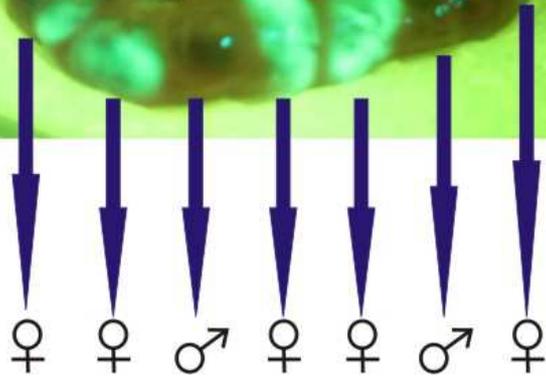
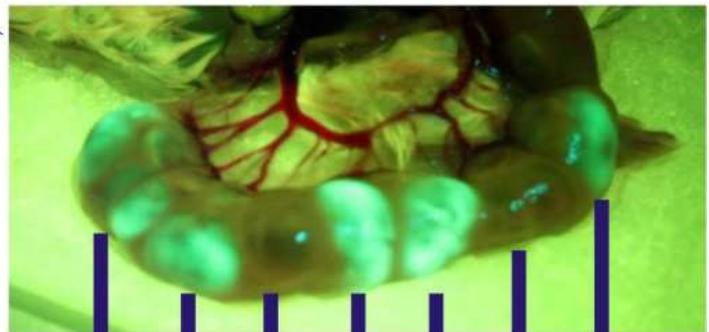
# **Anexos**



**ANEXO 1: (A) Esquema del sistema de sexado X-EGFP. (B) En la izquierda se muestran blastocistos de ratón en día 3,5 post-coito, y en la derecha se observa que solo los blastocistos hembras muestran expresión verde fluorescente.**



**ANEXO 2: Identificación de la proporción secundaria de los sexos, en fetos de día 12, X-EGFP (en verde se muestra a las hembras) mediante fluorescencia ultravioleta**



## ANEXO 3: Composición del medio de lavado y mantenimiento M2.

MEDIO M2						
REACTIVOS				Cantidades en gramos		
ORDEN	NOMBRE	TEMPERATURA	REFERENCIA	500 mL	250 mL	100 mL
1	Hepes	T° ambiente	Sigma H-4043	24,845	14,907	0,9938
2	Cloruro de Calcio (Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O)	T° ambiente	Sigma C-7902	0,1260	0,0756	0,0504
3	Cloruro de Sodio (NaCl)	T° ambiente	Sigma S-5886	27,665	16,599	11,066
4	Cloruro Potásico (KCl)	T° ambiente	Sigma P-5405	0,178	0,1068	0,0712
5	Fosfato Potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	T° ambiente	Sigma P-5655	0,081	0,0486	0,0324
6	Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	T° ambiente	Sigma M-1880	0,1465	0,0879	0,0586
7	Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	T° ambiente	Sigma S-8875	0,1745	0,1047	0,0698
8	Piruvato Sódico	Nevera 4°C	Sigma P-2256	0,0180	0,0108	0,0072
9	Glucosa Anhidra	T° ambiente	Sigma G-7021	0,5000	0,3000	0,2000
10	Lactato de Sodio 60% syrup (mL)	Nevera 4°C	Sigma L-7900	18,850	11,310	0,7540
11	Rojo de Fenol	Nevera 4°C	Sigma P-5530	0,0050	0,0030	0,0020
12	Penicilina	Nevera 4°C	Sigma P-4687	0,0312	0,0186	0,0124
13	Estreptomina	Nevera 4°C	Sigma S-9137	0,0250	0,0150	0,0010
14	Albúmina (BSA)	Nevera 4°C	Sigma A-3311	0,5000	0.25	0.1

**ANEXO 4: Formulación del medio KSOM**

<b>MEDIO KSOM</b>						
<b>REACTIVOS</b>				<b>Cantidades en gramos</b>		
<b>ORDEN</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>UBICACIÓN</b>	<b>REFERENCIA</b>	<b>500 mL</b>	<b>250 mL</b>	<b>100 mL</b>
1	Cloruro de Calcio (Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O)	T° ambiente	Sigma C-7902	0,1257	0,06285	0,0251
2	Cloruro de Sodio (NaCl)	T° ambiente	Sigma S-5886	27,759	13,880	0,5552
3	Cloruro Potásico (KCl)	T° ambiente	Sigma P-5405	0,0932	0,0466	0,0186
4	Fosfato Potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	T° ambiente	Sigma P-5655	0,0238	0,0119	0,0048
5	Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	T° ambiente	Sigma M-1880	0,0246	0,0123	0,0049
6	Lactato de Sodio 60% syrup	Nevera 4°C	Sigma L-7900	0,7150	0,3575	0,1430
7	Glucosa Anhidra	T° ambiente	Sigma G-7021	0,0180	0,0090	0,0036
8	Piruvato Sódico	Nevera 4°C	Sigma P-2256	0,0110	0,0055	0,0022
9	Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	T° ambiente	Sigma S-5761	10,500	0,525	0,2100
10	Glutamina	Nevera 4°C	Sigma G-5763	0,0735	0,0365	0,0146
11	EDTA	T° ambiente	Sigma E-6635	0,0019	0,0009	0,0004
12	Penicilina	Nevera 4°C	Sigma P-4687	0,03145	0,0156	0,0062
13	Estreptomina	Nevera 4°C	Sigma S-9137	0,0250	0,0120	0,0050
14	Rojo de Fenol	Nevera 4°C	Sigma P-5530	0,0050	0,0025	0,0010
15	Aminoácidos esenciales 50X	Nevera 4°C	Sigma B-6766	10	5	2
16	Aminoácidos no esenciales 100X	Nevera 4°C	Sigma M-7145	5	2,5	1
17	Albúmina (BSA)	Nevera 4°C	Sigma A-3311 Sigma A-9647	0,5	0,25	0,1

**ANEXO 5: Formulación del medio HTF (Human tubal fluid)**

<b>HTF (Human tubal fluid)</b>						
<b>REACTIVOS</b>				<b>Cantidades en gr/mL</b>		
<b>ORDEN</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>REFERENCIA</b>	<b>500 mL</b>	<b>250 mL</b>	<b>100 mL</b>
1	Cloruro de Calcio (Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O)	T° ambiente	Sigma C-7902	0,15000	0,07500	0,01500
2	Cloruro de Sodio (NaCl)	T° ambiente	Sigma S-9625*	296,875	148,438	0,29688
3	Cloruro Potásico (KCl)	T° ambiente	Sigma P-5405*	0,17480	0,08740	0,01748
4	Fosfato Potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	T° ambiente	Sigma P-5655	0,02520	0,01260	0,00252
5	Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	T° ambiente	Sigma M-1880	0,02460	0,01230	0,00246
6	Lactato de Sodio 60% syrup (mL)	Nevera 4°C	Sigma L-7900	171,000	0,85500	0,17100
7	Piruvato Sódico	Nevera 4°C	Sigma P-2256	0,01820	0,00910	0,00182
8	Glucosa Anhidra	T° ambiente	Sigma G-7021	0,25000	0,12500	0,02500
9	Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	T° ambiente	Sigma S-5761	105,000	0,52500	0,10500
10	Penicilina	Nevera 4°C	Sigma P-4687*	0,03750	0,01875	0,00375
11	Estreptomina	Nevera 4°C	Sigma S-9137	0,02500	0,01250	0,00250
12	Rojo de Fenol	Nevera 4°C	Sigma P-5530	0,00200	0,00100	0,00020
17	Albúmina (BSA)	Nevera 4°C	Sigma A-311	2	1	0.2

**ANEXO 6: Cebadores usados para la determinación del sexo y en las RT-PCRs**

<b>Gene</b>	<b>Primer sequence 5'-&gt;3'</b>
<b>DYzEms3</b>	TAGGATGGTAAGCCCAATGC/ TTGGTTGGTTAATTGTTTGGG
<b>Rn18s</b>	AGAAACGGCTACCACATCCAA/ CCTGTATTGTTATTTTCGTCACTACCT
<b>H2az</b>	AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG/CACCACCAGCAATTGTAGCCTTG
<b>Osgin2</b>	TCCGGCCTTACTGCCGCTGA/TGGCTGGCTTGAGTTACGGCC
<b>Nanog</b>	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG/CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG
<b>Pou5f1</b>	GGAGAGGTGAAACCGTCCCTAGG/AGAGGAGGTTCCCTCTGAGTTGC