

## SEPARACION DE ESPERMATOZOIDES “Y” DE EYACULADO DE CONEJO POR MEDIO DE GRADIENTES DE DENSIDAD DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA

P.J.E. Hernández\*, R.F. Fernández\*, C.J. Reyes\*\*, P.G. Cerezo\*\*\*, J.L. Echegaray\*\*\*\*  
y B. Mendoza\*\*\*\*

\*Laboratorio “Manejo de la Reproducción”. Universidad Autónoma metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán 04960. México, D.F.; \*\*Clínica Privada. México, D.F.; \*\*\*REPROMEDICA S.A DE C.V. Centro Internacional de Reproducción Asistida. México, D.F.; \*\*\*\*Unidad de Investigación Aplicada en Producción Cunicola (UIAPC), de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Texcoco, Estado de México

**RESUMEN:** Se obtuvieron 33 eyaculados de conejos Nueva Zelanda blancos para realizar la separación de espermatozoides “Y” por medio de diferentes gradientes de densidad (10, 15 y 20%) de Albúmina Sérica Humana (HSA). Las características evaluadas en fresco fueron: volumen, porcentaje de motilidad progresiva, espermatozoides vivos, morfología normal y concentración, siendo los valores de: 1.19 mL, 82.72%, 90.90%, 89.96% y  $773.63 \times 10^6$ , respectivamente. El semen fue diluido 1:1 en un medio de citrato de sodio y glucosa, para posteriormente colocarlo en tubos que contenían gradientes de concentraciones de albúmina al 20%, 15% y 10%, colocándose a una temperatura de 37.5°C. Una vez realizado lo anterior se retiró cada una de las fracciones con intervalo de 10 minutos, determinando en cada fracción el porcentaje de motilidad, espermatozoides vivos y concentración espermática. Se observó una disminución importante de la motilidad del semen fresco (82.72%) en comparación a la motilidad progresiva de la capa de HSA al 20% que fue de 35.45%. Conforme los espermatozoides alcanzan las capas de mayor densidad el porcentaje de vivos disminuye siendo de 88.39, 86.21 y 83.06% para el 10, 15 y 20% de HSA respectivamente, observándose lo mismo con relación a la concentración espermática (504.24, 376.06 y  $211.81 \times 10^6$ /ml). De un total de 30 partos después de la inseminación artificial con espermatozoides obtenidos de la capa con 20% de HSA, nacieron 187 gazapos siendo el 72.72% machos y 27.27% hembras. Los resultados indican que mediante gradientes de densidad de HSA es posible realizar la selección de espermatozoides “Y” en semen de conejo y consecuentemente producir más machos.

(Palabras clave: separación de espermatozoides; Albúmina Sérica Humana; conejo)

---

## SEPARATION OF “Y” SPERMATOOA IN RABBIT SEMEN BY DIFFERENT DENSITY GRADIENTS OF HUMAN SERUM ALBUMIN

**ABSTRACT:** Thirty-three ejaculations of white New Zealand rabbits were obtained to perform the separation of “Y” spermatozoa by different density gradients (10, 15 and 20%) of Human Serum Albumin (HSA). The characteristics evaluated in fresh semen were: volume, progressive motility percentage, live spermatozoa, normal morphology and concentration, being these values: 1.19 ml, 82.72%, 90.90%, 89.96% and  $773.63 \times 10^8$  respectively. Semen was diluted 1:1 in a medium of sodium citrate and glucose; then, 1ml of diluted semen was added in tubes containing gradients of albumin at 20%, 15% and 10%, at a temperature of 37.5°C. Latter, each of the factions was retired within intervals of 10 minutes each, determining motility percentage, live spermatozoa and spermatic concentration in each fraction. An important decrease of fresh semen motility was observed (82.72%) compared to the progressive motility in the HSA layer at 20%, which was 35.45%. As spermatozoa reach the layers of higher density, the percentage of the live ones decreases being 88.39, 86.21 and 83.06 for the 10, 15 and 20% of HAS respectively, observing the same related to spermatic concentration (504.24, 376.06 and  $211.81 \times 10^6$ /ml). From 30 births after artificial insemination with spermatozoa obtained from the layer with 20% of HSA, 187 rabbits were born being the 72.72% males and 27.27 females. The results indicate that it is possible to perform the selection of “Y” spermatozoa in rabbit semen and consequently produce more males, by the use of density gradients of HSA.

(Key words: spermatozoa separation; Human Serum Albumin; rabbit)

---

## INTRODUCCIÓN

La preselección del sexo de la descendencia es de gran importancia por sus repercusiones genéticas y económicas en la producción animal, en humanos se está aplicando cuando existe el riesgo de enfermedades genéticas unidas al cromosoma sexual (11).

El sexo genético de un mamífero depende de la fertilización, si el óvulo es fertilizado por un espermatozoide que contiene el cromosoma "X" o "Y", así el sexo puede ser predeterminado si los espermatozoides son separados antes de la inseminación artificial en función de sus cromosomas. La única diferencia establecida entre el cromosoma "X" y "Y" es la cantidad de DNA, en los mamíferos el espermatozoide "X" contiene 2.8-7.5% más de DNA que los espermatozoides "Y" en el cromosoma sexual (4).

Numerosos métodos físicos, bioquímicos e inmunológicos han sido propuestos para alterar la proporción del sexo en la descendencia, siendo el método de citometría de flujo el que mejor resultados brinda, ya que de espermatozoides clasificados con cromosoma "X" y "Y" se han obtenido el 94% y 81% de eficiencia respectivamente (11), sin embargo, el empleo de la citometría de flujo como método para producir semen sexado tiene limitaciones, entre estas se pueden señalar el número limitado de espermatozoides que pueden clasificarse en un periodo de tiempo ( $3.5 \times 10^5$ ), el incremento de la mortalidad embrionaria presuntamente relacionada con la presencia de un flurocromo en el DNA, así como el elevado costo del aparato (4,11).

En 1973 se reporta que aproximadamente el 85% de los espermatozoides humanos que migran a través de diferentes gradientes de concentración de Albúmina Sérica Bovina (BSA) tienen cromosoma "Y" (8). Existe discrepancia con respecto a estos resultados ya que si bien algunos autores los confirman (2, 6,14), otros los refutan (15, 18,19).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el método de separación de espermatozoides "Y" de semen de conejo por medio de diferentes gradientes de densidad de HSA e inseminar conejas con los espermatozoides obtenidos para determinar si se puede preseleccionar el sexo en los mismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron 33 eyaculados de conejos Nueva Zelanda Blancos mediante vagina artificial a una temperatura promedio de 49.44°C y tubos colectores de plástico graduados.

El volumen se determinó directamente del tubo graduado en mL. La muestra fue diluida 1:1 con un diluyente de citrato de sodio y glucosa (33.3 mM) (1,7). Para observar la motilidad progresiva se colocó una gota de cada muestra en un portaobjetos, al que se le colocó un cubreobjetos para su análisis con un objetivo de 10X de un microscopio de contraste de fases y una platina a 37°C, solo las muestras que obtuvieron una motilidad progresiva superior o igual a 75% fueron utilizadas para la separación de espermatozoides (12, 16,17).

La viabilidad y morfología espermática fue determinada de un frotis con una tinción de eosina-nigrosina, así como clasificando los normales y anormales (7,13).

La concentración fue calculada usando una cámara de Neubauer previa dilución de 1:200 en una pipeta de Thomas y contando los espermatozoides con un objetivo de 40X (10, 12,16).

### Preparación de las columnas

Para obtener la separación de espermatozoides "Y" de eyaculado de conejo se utilizó una modificación de la técnica descrita por Ericsson *et al.* (8). Previo a la colección del semen se prepararon las columnas, que consistió en colocar en el fondo de un tubo de plástico cónico con capacidad de 15 mL. 1 mL de Seroalbúmina humana (HSA) al 20%, posteriormente se colocó 1 mL de HSA al 15% y otro mL de HSA al 10%, finalmente se adicionó el semen diluido, tratando de no mezclar las diferentes fracciones que se adicionaron. Una vez realizado lo anterior la columna se colocó en baño María a una temperatura de 37.5°C (8). Las diferentes fracciones de la columna fueron retiradas con intervalos de diez minutos. En cada fracción se le evaluó motilidad, viabilidad y concentración espermática.

Con los espermatozoides que se obtuvieron de la fracción de 20% de HSA, se realizó la inseminación artificial de 33 conejas. La concentración promedio fue de  $105 \times 10^6$  en un volumen de 0.5 mL por inseminación, inmediatamente después de este procedimiento se les inyectó 150 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) para inducir la ovulación (11). El sexado de los gazapos se realizó a partir de los 8 días de edad (1).

**Análisis estadístico.** Para comparar las características espermáticas en los diferentes gradientes de densidad de HSA, se realizó un análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey evaluando el grado de significación para  $p < 0.05$ . Para este análisis se empleó el programa SPSS versión 10.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1, presenta el promedio de las características espermáticas (volumen, motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos, morfología normal y concentración espermática) de 33 eyaculados de conejo.

En la Tabla 2, se muestran los promedios de motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos y concentración en semen fresco, en las diferentes capas de HSA (10, 15 y 20%) que se utilizaron para la separación de espermatozoides "Y". Se apreció que conforme los espermatozoides alcanzan las capas de mayor densidad disminuyen estos valores, así tenemos que la motilidad varió de 82.72% en semen fresco a 35.45% en la capa de HSA al 20%, lo mismo se observa con relación a la concentración que fue de 773.63 a 211.81X10<sup>6</sup>/mL. Esta disminución fue menor en el % de vivos, ya que de 90.90% solo descendió a 83.06%.

En la Tabla 3 se observa el total de gazapos y porcentaje de machos y hembras de 30 partos, después de la inseminación artificial con espermatozoides obtenidos de la capa de albúmina sérica humana al 20%.

El volumen de eyaculados de conejos obtenidos con vagina artificial fue como promedio de 1.19 mL similar a lo reportado por Nervo *et al.* (13) con el empleo de conejos híbridos, aunque superior a lo reportado por Dal Bosco *et al.* (5) quienes obtuvieron 0.85 mL, se atribuye la diferencia al hecho de que Dal Bosco *et al.* (5), muestreaban conejos híbridos dos veces por semana y en cada obtención realizaban dos eyaculados con intervalos de 20 minutos entre las tomas, mientras que en esta investigación se obtuvo un eyaculado por conejo por semana, como señala Alvaríño (1) el número de eyaculados por semana influye en este indicador.

En el semen fresco se obtuvo una motilidad de (82.72%), similar a Viudes de Castro y Vicente,(16) que fue de 80% utilizando machos de la misma raza y evaluada con una platina a 37°C y superior a lo encontrado por Castellini y Lattaioli, (3) que fue de 65%, lo que pudiera deberse a la temperatura ambiente alcanzada de 25°C, 1 hora después de su obtención.

El porcentaje de espermatozoides vivos en el semen fresco fue de 90.90% superior a lo reportado en 1996 por Dal Bosco *et al.* (5) que fue 77%, pero es inferior a lo reportado por Echegaray *et al.* (7) que obtuvieron 94.30%, al obtener semen 3 veces por semana. Nervo *et al.* (13) reportaron que se incrementaba el porcentaje de vivos obteniendo dos eyaculados consecutivos con intervalos de 15 minu-

tos por semana, siendo de 81% y 83% en el primero y segundo eyaculado, respectivamente.

En cuanto a la morfología normal en el semen fresco fue 89.96%, superior a lo reportado por Finzi *et al.* (9) que reportan 81.8 % al trabajar con conejos de 9 meses de edad, en un ambiente de temperatura de 20.3°C, tres veces a la semana para obtener dosis para IA, reportando estos autores que los espermatozoides son muy sensibles a altas temperaturas y que las anomalías morfológicas pueden indicar un estrés calórico sufrido por el animal.

La concentración espermática que se obtuvo en promedio en semen fresco fue de 773.63X10<sup>6</sup>/mL superior al rango reportado por diferentes autores como Dal Bosco *et al.* (5), Castellini y Lattaioli (3) y Nervo (13) con valores de 450-470x 10<sup>6</sup>/mL, 200x 10<sup>6</sup> /mL y 307x 10<sup>6</sup>/mL respectivamente, pero en estas investigaciones se emplearon híbridos y se plantea que una de las causas que afecta la concentración es la raza (1).

El resultado general de la Tabla 2 muestra a los tres indicadores evaluados: motilidad, espermatozoides vivos y concentración en los diferentes gradientes, los cuales disminuyeron significativamente con respecto al semen fresco.

La motilidad progresiva de los espermatozoides de semen de conejo obtenidos en los gradientes de 10, 15 y 20% de HSA (Tabla 2) es inferior a lo reportado por varios autores, con el empleo de semen de humano se observaron motilidades muy superiores, así tenemos a Ericsson *et al.* (8) quienes trabajando con concentraciones de 6, 10 y 20% de BSA, reportan una motilidad progresiva de 91.00, 75.00 y 95.00% respectivamente, lo mismo sucede con lo reportado por Ross *et al.* (15), los que trabajaron con 3 capas con diferentes densidades de BSA al 10, 15 y 25%, lograron una motilidad al 25% de 77%. Dmowski *et al.* (6) utilizando solamente 2 capas de HSA con densidades de 10 y 20%, reportaron una motilidad progresiva 64.00 y 77.00% respectivamente, mientras que Beerninkk *et al.* (2) utilizando tres diferentes gradientes de HSA (7.5, 12.5 y 20%) encontraron un porcentaje de motilidad progresiva de 80-86% en HSA al 20%. En estas evaluaciones el semen humano fue centrifugado antes de su evaluación para limpiarlo de restos de células de descamación y plasma seminal, lo que ocasiona la capacitación de los espermatozoides incrementando su motilidad, la centrifugación también se realizó en las diferentes muestras de los gradientes antes de su evaluación, en esta investigación no se realizó centrifugación, ni en semen fresco ni después de la separación de los espermatozoides en los diferentes gradientes de densidad de HSA.

**TABLA 1.** Características de semen fresco de 33 eyaculados de conejo./ *Characteristics of fresh semen of 33 rabbit ejaculates*

	Vol (mL)	% Motilidad progresiva	% Vivos	% Normales	Concentración (X10 <sup>6</sup> /mL)
Promedio±DE.	1.19±0.30	82.72±6.62	90.90±3.10	89.96±2.59	773.63±154.69

DE= Desviación estándar.

**TABLA 2.** Motilidad progresiva, espermatozoides vivos y concentración en semen fresco y en diferentes capas de albúmina sérica humana (10, 15 y 20%), de 33 eyaculados de conejo./ *Progressive motility, live spermatozoa and concentration in fresh semen and in different levels of Human Serum Albumin (10, 15 and 20%) of 33 rabbit ejaculates*

Muestras	(%) Motilidad	Vivos (%)	Concentración (X10 <sup>6</sup> /ml)
Semen fresco	82.72±6.62 <sup>a</sup>	90.90±3.10 <sup>a</sup>	773.63±154.69 <sup>a</sup>
*Semen-sex 10% HSA**	60.15±9.05 <sup>b</sup>	88.39±3.77 <sup>b</sup>	504.24±150.89 <sup>b</sup>
*Semen-sex 15% HSA**	45.75±6.38 <sup>c</sup>	86.21±3.57 <sup>b</sup>	376.06±132.78 <sup>c</sup>
*Semen-sex 20% HSA**	35.45±3.82 <sup>d</sup>	83.06±3.57 <sup>c</sup>	211.81±104.98 <sup>d</sup>

Letras diferentes por columna difieren (p<0.05)

\* = semen preseleccionado en diferentes capas de albúmina humana.

\*\*= Seroalbúmina Humana (HSA).

**TABLA 3.** Total de gazapos y porcentaje de machos y hembras después de la inseminación artificial con espermatozoides obtenidos de la capa de albúmina sérica humana al 20% a 33 conejas./ *Total young rabbits and male/female percentage after artificial insemination with spermatozoa obtained from Human Serum Albumin at 20% in 33 female rabbits*

	# de IA	# de partos	Total de gazapos	# de gazapos machos	# de gazapos hembras
TOTAL	33	30	187	136	51
Promedio ± DE/camada			6.23±2.51	4.53±1.52	1.70±1.15
%				72.72	27.27

IA= inseminación Artificial.

La concentración espermática obtenida en esta investigación en las diferentes fracciones de la columna de HSA (10, 15 y 20%) fue de 504.24, 376.06 y 211.81X10<sup>6</sup>/mL, respectivamente en semen de conejo, trabajando con una concentración total inicial en promedio de 773.63X10<sup>6</sup> mientras que trabajando con semen humano Dmowski *et al.* (6) usando 2 capas de HSA con densidades de 10 y 20%, reportaron una concentración espermáticas de 65.00 y 16.00X10<sup>6</sup>/mL respectivamente, siendo la concentración inicial de 395X10<sup>6</sup>, posteriormente Beernink *et al.* (2) determinaron en semen humano una concentración espermática en la capa de HSA al 20% de solo 14X10<sup>6</sup>, siendo la concentración inicial de 220X10<sup>6</sup>, hay que considerar que la concentración inicial en esta investigación fue muy superior (773.63X10<sup>6</sup>), a la que se inició con semen humano (220 a 395X10<sup>6</sup>).

El porcentaje promedio de efectividad de la técnica para la obtención de machos fue de 72.72%, su-

perior al reportado por Zavos (19). Este autor trabajando con conejos obtuvo el 55.3% de machos, utilizando 2 capas de BSA al 10 y 20%; nuestro resultado es similar al reportado por Beernink *et al.* (2), en humanos de 1,034 nacimientos post-I.A. con el empleo de espermatozoides preseleccionados con 73.50% varones, Rose y Wong, (14) utilizando tres capas de HSA al 10, 12 y 20% reportaron de un total de 31 gestaciones el 81.00% de niños.

Se concluye que la técnica de preselección del sexo mediante gradientes de densidad de HSA es adecuada para seleccionar espermatozoides con cromosoma "Y" de eyaculados de conejo y producir más machos en la camada.

## REFERENCIAS

- Alvariño, R.M. (1993): Control de la Reproducción en Conejos. *Ediciones Mundi-Prensa*. España.

2. Beernink, F.J.; Dmowski, W.P. Ericsson, R.J. (1993): Sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertil. Steril.* 59(2): 382-386.
3. Castellini, C. y Lattaioli, P. (1999): Effect of number of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* 57:111-120.
4. Chatterjee, R.N. y Majumdar, A.C. (2000): Enrichment of Y-bearing buck spermatozoa using bovine serum albumin column. *Indian J. Anim.Sci.* 70(7): 688-690.
5. Dal Bosco, A., Scuota, S., Castellini, C., Cenci, T. (1996): Study of an artificial vagina to reduce the microbial contamination of rabbit semen. *World Rabbit Sci.* 4(4): 201-204.
6. Dmowski, W.P.; Gaynor, L.; Rao, R.; Lawrence, M.; Scommegna, A. (1979): Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. *Fertil. Steril.* 31(1): 52-57.
7. Echegaray, T.J.L.; Olvera, C.J.A.; Salcedo, B.R.; Mendoza, A. (2004): Quality and fertility of preserved rabbit semen at 15°C, in gelatin supplemented extender. *The journal of applied rabbit research cuni-sciences. World Rabbit Sci.* 8<sup>th</sup> World Congress. Puebla-México.
8. Ericsson, R.J.; Langevin, C.N.; Nishino, M. (1973): Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature.* 246: 421-424.
9. Finzi, A.; Morera, P.; Kuzminsky, G. (1995): Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. *World Rabbit Sci.* 3(4): 157-161.
10. Hafez (2000): Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-Hill internamericana. Sexta edición. México.
11. Johnson, L.A.; Flook, J.P. and Hawk, H.H. (1989): Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41: 199-203.
12. Moce, E.; Lavara, R.; Vicente, J.S. (2003): Effect of an asynchrony between ovulation and insemination on the results obtained after insemination with fresh or frozen sperm in rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 75: 107-118.
13. Nervo, T. (2005): Características medias del eyaculado del conejo tras una recogida del semen semanal. *Cunicultura.* 30(30): 173-174.
14. Rose, G.A.; Wong, A. (1998): Experiences in Hong Kong with the theory and practice of the albumin column method of sperm separation for sex selection. *Human Reprod.* 13(1): 146-149.
15. Ross, A.; Robinson, J.A.; Evans, H.J. (1975): Failure to confirm separation of X and Y bearing human sperm using BSA gradients. *Nature.* 253: 354-355.
16. Viudes de Castro, M.P.; Vicente, J.S. (1996): A simple method for freezing rabbit semen with successful results on fertility and prolificity. *Anim. Reprod. Sci.* 44: 195-201.
17. Viudes de Castro, M.P.; Vicente, J.S. (1997): Effect of sperm count on the fertility and prolificity rates of meat rabbit. *Anim. Reprod. Sci.* 46: 313-319.
18. Wang, H.X.; Flaherty, S.P.; Swann, N.J. and Matthews, C.D. (1994): Assessment of the separation of X-and Y- bearing sperm on albumin gradients using double-label fluorescence in situ hybridization. *Fertil.Steril.* 61(4): 720-726.
19. Zavos, P.M. (1985): Sperm separation attempts via the use of albumin gradients in rabbits. *Theriogenology.* 23(6): 875-879.

**(Recibido 10-12-2006; Aceptado 28-8-2007)**