

**Copello, Matías Javier**

*Semen sexado en conejos: efecto de tratamientos de Swim-up y Percoll en la tasa de nacimientos de machos y hembras*

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria  
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Copello, M. J. 2011. Semen sexado en conejos : efecto de tratamientos de Swim-up y Percoll en la tasa de nacimientos de machos y hembras [en línea]. Trabajo Final. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina. Disponible en:  
<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/semen-sexado-conejos-efecto-tratamientos.pdf> [Fecha de consulta:.....]

(Se recomienda indicar fecha de consulta al final de la cita. Ej: [Fecha de consulta: 19 de agosto de 2010]).

# PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias  
Ingeniería en Producción Agropecuaria

## **“Semen sexado en conejos: efecto de tratamientos de Swim-up y Percoll en la tasa de nacimientos de machos y hembras”**

Trabajo final de graduación para optar por el título de  
Ingeniero en Producción Agropecuaria



Autor: Matías Javier Copello

Profesor Tutor: Ing. P.A. Marina J. Sansiñena, MSc., Ph.D.

Fecha: Julio de 2011

## Resumen

La cría de conejos industrial o cunicultura es una producción animal intensiva de gran eficiencia. Una tecnología de interés es trabajar en el área de la biotecnología reproductiva, explorando la posibilidad del sexado de los espermatozoides a través de técnicas simples de laboratorio. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de dos técnicas de preparado y purificación de espermatozoides (Swim-up y Percoll), sobre la tasa esperada de 50 % progenie macho y 50 % progenie hembra. Para este estudio, se utilizaron 4 machos híbridos de fertilidad comprobada y buen estado corporal. Los eyaculados se obtuvieron utilizando vagina artificial sólida (temperatura de extracción 42°C). Luego de la evaluación inicial (motilidad masal, concentración, motilidad individual progresiva) se procedió a realizar un pool heterospermático, y asignarlo aleatoriamente a los tratamientos control, Swim-up o Percoll. Todos los eyaculados fueron diluidos inicialmente en diluyente comercial específico para conejos. Una vez diluido, el eyaculado fue mantenido a 37°C en platina térmica y baño termoestabilizado. Para el tratamiento Swim-up, la muestra fue centrifugada (3 min, 800 rpm) y luego fue incubada en estufa a 37°C por 45 min. El tratamiento Percoll fue realizado en dos gradientes (45 y 90%), con una centrifugación (3 min 400 rpm). Bandas de hembras de fertilidad comprobada y buen estado corporal fueron tratadas con PMSG i.m. (20 UI/coneja, 48 hs previo a la inseminación), e inseminadas con una dosis de 0,5 ml con una concentración de 30-40 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/dosis, siendo su ovulación inducida con 20 microgramos GnRH i.m./coneja inmediatamente luego de la inseminación. Los animales nacidos fueron sexados de acuerdo a procedimiento estándar, por observación visual de los genitales a los 35 días post-nacimiento, y confirmados a los 60 días. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de la varianza, seguido de la prueba de Tukey con el programa InfoStat versión 2010e. La inseminación de las hembras con pool heterospermático de 4 machos (control) resultó en una distribución de la progenie de 49,44% (89) machos y 50,56 % (91) hembras, sobre un total de 180 animales sexados. La preparación de semen del mismo pool heterospermático con los tratamientos de Swim-up y Percoll determinaron una desviación significativa ( $p < 0,01$ ) del sexo de la progenie respecto del control. El tratamiento de Swim-up obtuvo un porcentaje de 63,74% (109) de progenie macho, esto significó un desvío del 28,92% respecto del control ( $p < 0,01$ ). A su vez, con el tratamiento de Percoll se obtuvo un porcentaje de 67,57% (125) de progenie hembra, significando esto un desvío del 33,64% respecto del control ( $p < 0,01$ ). Los resultados obtenidos indican que es posible, mediante tratamientos de purificación y lavado del eyaculado, desviar significativamente de la media de 50:50 la proporción de machos o hembras nacidas. Estos resultados tienen el potencial de otorgar una herramienta al productor cunícola para la selección o incremento del sexo de la progenie a favor de machos o hembras, según sus necesidades productivas. Sería interesante evaluar si se observa el mismo efecto de los tratamientos sobre los eyaculados de otras especies productivas.

## Índice de Contenidos

### Contenido

Resumen .....	1
Introducción.....	4
Determinación del sexo en especies domésticas.....	4
Diferencias en el contenido de ADN .....	4
Método de selección de sexo .....	5
Selección del sexo de los espermatozoides.....	5
Sensibilidad al pH .....	6
Carga eléctrica de la superficie de la membrana.....	6
Diferencias en la velocidad de migración .....	6
Diferencias en el contenido de ADN (citometría).....	7
Diferencias de densidad.....	9
Objetivos.....	11
Materiales y Métodos .....	11
Tratamiento Control.....	12
Técnica Swim-Up .....	15
Técnica con gradientes – Percoll .....	16
Sexado de los Gazapos .....	18
Análisis estadístico .....	19
Resultados.....	20
Discusión .....	24
Anexos .....	27
1) Parte estadística .....	27
2) Fotografías .....	36
Agradecimientos .....	40
Bibliografía .....	41

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Diferencia del contenido de ADN (Garner, 2006). .....	5
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas del método swim-up (Henkel et al., 2003) .....	7
<b>Tabla 3.</b> Ventajas y desventajas de densidad de gradientes (Henkel et al., 2003) .....	10
<b>Tabla 4.</b> Escala MIP .....	13
<b>Tabla 5.</b> Nacidos vivos totales, % de machos, % de hembras y peso al destete para cada tratamiento. ....	20
<b>Tabla 6.</b> Promedio de las variables % machos, peso al destete y nacidos vivos totales para cada tratamiento .....	20

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Principio de la citometría de flujo. Adaptado de Cotinot y col. (1993) ..	8
<b>Figura 2.</b> Vagina y tubos de extracción utilizados para la extracción de semen ..	12
<b>Figura 3.</b> Diagrama Cámara de Neubauer (Cueto et al. 1993) .....	14
<b>Figura 4.</b> Armado de las columnas de Percoll. ....	17
<b>Figura 5.</b> Visualización de los sexos a los 30 días de vida .....	19
<b>Figura 6.</b> Gráfico de barras, efectos de los tratamientos en el porcentaje de machos. ....	22
<b>Figura 7.</b> Gráfico de barras, porcentaje de machos y hembras logrados en cada tratamiento .....	22
<b>Figura 8.</b> Gráfico de barras, peso al destete (gr) a los 35 días de edad según cada tratamiento. ....	23

## Índice de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> Técnica Swim-up .....	16
<b>Esquema 2.</b> Técnica Percoll .....	18

## **Introducción**

### *Determinación del sexo en especies domésticas*

La preselección del sexo de la descendencia es de gran importancia tanto por sus repercusiones genéticas como así también económicas en la producción animal. En humanos, la comunidad médica se dedicó al desarrollo de técnicas para la selección del sexo, respondiendo a la necesidad de prevenir las enfermedades genéticas unidas al cromosoma sexual (Hernández et al., 2008). Otra área en donde la preselección del sexo podría intervenir es la recuperación de animales salvajes. En la producción pecuaria, la preselección del sexo de la prole o la desviación de la media hacia machos o hembras representaría una herramienta productiva de suma utilidad. Una aceleración en los programas de mejora genética, un incremento en la eficiencia biológica y económica de la producción y una mayor flexibilidad en los sistemas de manejo son algunas de las ventajas que esta técnica podría aportar a las explotaciones ganaderas (Schenk et al., 1999; Maxwell et al., 2004).

Un ejemplo claro de la aplicación de esta técnica a nivel ganadero es en el ganado bovino, en donde la obtención de hembras resulta fundamental para las explotaciones lecheras. En la producción cunícola, la estrategia de la preselección o desviación del sexo de la descendencia podría ser aprovechada en los núcleos de multiplicación, ya que les permitiría producir más machos terminales (provenientes de líneas paternas especializadas para tal fin), y hembras híbridas de acuerdo a las necesidades de producción.

### *Diferencias en el contenido de ADN*

Los métodos empleados para separar los espermatozoides en mamíferos se basan en la evidencia que aquellos espermatozoides portadores del cromosoma X tienen mayor peso que los espermatozoides portadores del cromosoma Y, debido a una mayor cantidad de cromatina. La cantidad de ADN del cromosoma X en relación con el cromosoma Y varía significativamente entre las especies. Las diferencias del contenido de ADN entre los espermatozoides X e Y, fueron

calculadas por medio de citometría de flujo (Garner, 2006). La diferencia entre la especie cunícola es de 3,0% (Tabla 1).

**Tabla 1.** Diferencia del contenido de ADN (Garner, 2006).

Especie	Diferencia X-Y (%)
Humana	2,8
Cunícola	3,0
Murina	3,4
Caprina	3,5
Porcina	3,6
Equina	3,7
Bovina	3,8
Canina	3,9
Ovina	4,2
Chinchilla	7,5
Ratón de Oregón	12,5

#### *Método de selección de sexo*

Existen diferentes métodos para seleccionar el sexo en las especies mamíferas, utilizándose principalmente dos estrategias: a) el sexado de embriones pre-implantados y b) la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X de aquellos del cromosoma Y.

#### *Selección del sexo de los espermatozoides*

La separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X de los portadores del Y se basa en la detección de por lo menos una de las siguientes diferencias entre estos dos tipos celulares (Palma, 2001)

- Sensibilidad al pH
- Carga eléctrica de la superficie de la membrana
- Antígenos de superficie
- Velocidad de migración
- Contenido de ADN (citometría)
- Diferencias de densidad

Todos estos métodos se basan en las diferencias existentes entre los espermatozoides X y los Y. Cualquier técnica de separación espermática debe cumplir con tres premisas fundamentales: producir una desviación evidente en la tasa de espermatozoides X/Y de una población espermática, no interferir en la capacidad fecundante in vivo o in vitro de los espermatozoides separados y, por último, dar lugar a la obtención de descendencias vivas que confirmen la desviación eficaz (Jafar y Flint, 1996)

#### *Sensibilidad al pH*

Unterberger (1932) sugirió que un fluido seminal muy alcalino (básico) favorecía la sobrevivencia de los espermatozoides portadores del cromosoma Y. Además insinúo que el medio vaginal muy ácido favorecería los portadores del cromosoma X. Este método fue utilizado en conejos por Wakim (1972), en donde demostró que la proporción de sexos puede ser modificada de acuerdo con el pH de la vagina a la hora del apareamiento. Cuando el pH se encuentra entre 6,5 – 7,5 prevaleció el sexo femenino, y con un pH de 7,5 – 8,3 se podría esperar animales de sexo masculino

#### *Carga eléctrica de la superficie de la membrana*

Fue demostrado por medio de electroforesis realizadas en espermatozoides humanos y conejos, que los mamíferos poseen carga eléctrica negativa. Entre los años 1932 y 1949 se llevaron a cabo los primeros experimentos en conejos para separar por medio de electroforesis (técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico) los espermatozoides portadores del cromosoma X, de aquellos portadores del cromosoma Y. Se obtuvo 62% de hembras y 25% de machos de los animales nacidos a partir de la I.A. con espermatozoides que migraron para el ánodo y el cátodo respectivamente (Gordon, 1957).

#### *Diferencias en la velocidad de migración*

Sobre la base de la diferencia de peso, es posible separar espermatozoides X e Y por su diferencia de velocidad de migración. Hay varios métodos para lograr esta migración. La técnica de Swim-up fue desarrollada por Parrish et al., en 1984, y se basa en la capacidad migratoria de los espermatozoides. Éstos son

incubados en el fondo de un tubo con medio de cultivo a 39°C por un periodo determinado, en el cual los espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea ascienden a través de la columna de medio. Luego, determinado volumen del sobrenadante, que contiene la subpoblación de espermatozoides con los mejores índices de motilidad, es extraído para determinar su concentración. En humanos, Check et al., (1989) reportaron 81% de hijos varones, luego de la inseminación con espermatozoides preparados y modificados bajo esta técnica. En bovinos Wolf, C.A. et al., (2008) reportaron en la especie bovina una desviación de 58,45% en machos y 41,55% en hembra utilizando Swim-up.

A continuación se muestra la tabla N°2, en donde se pueden observar las ventajas y desventajas del swim-up

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas del método swim-up (Henkel et al., 2003)

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Fácil de realizar	Restringido a eyaculados con alta motilidad y concentración
Barato	Bajo recupero
Por lo general se recupera una fracción “limpia” con espermatozoides de alta motilidad	Los espermatozoides pueden ser dañados por la reacción oxidativa
	Decrece significativamente el porcentaje normal de cromatina condensada

#### *Diferencias en el contenido de ADN (citometría)*

Predeterminar el sexo de la descendencia, utilizando espermatozoides separados en base a su contenido en ADN, es hoy en día una realidad en mamíferos, incluido el hombre, gracias a la citometría de flujo (Johnson, 2000). Esta técnica se basa en la diferente fluorescencia que emiten los espermatozoides tras la tinción de su ADN debida, a su vez, a la diferente cantidad de ADN que existe entre el cromosoma X e Y (Pinkel et al. 1982; Johnson et al. 1989). Los

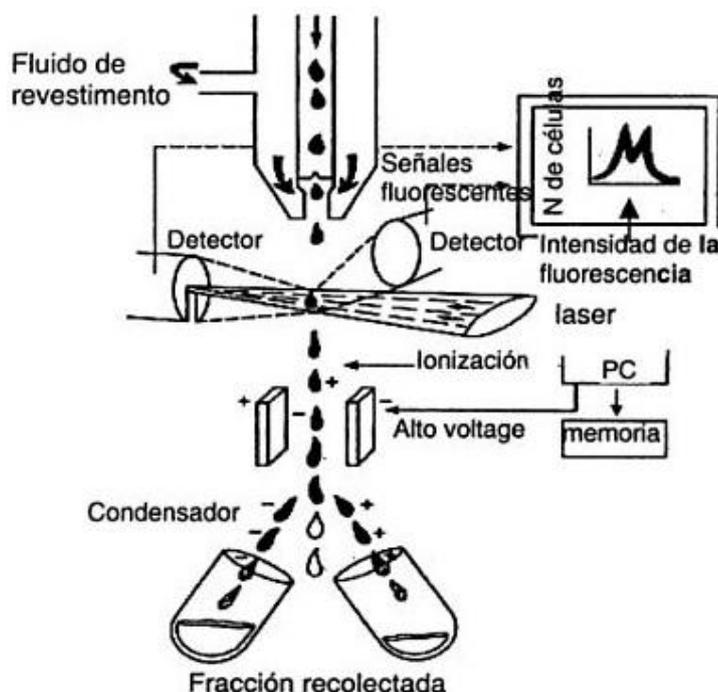
espermatozoides de las diferentes especies de interés en producción ganadera han sido separados mediante citometría de flujo en poblaciones X e Y, con purezas alrededor de un 90-95%, para ser después utilizados en combinación con diferentes técnicas de reproducción asistida (Johnson et al., 1989).

El procedimiento de separación de espermatozoides X e Y mediante citometría de flujo puede dividirse en dos diferentes fases:

- preparación y tinción de la muestra
- separación de los espermatozoides (Riera P.I., 2005).

El principio del sexado por medio de citometría de flujo se presenta en la Figura 1

**Figura 1.** Principio de la citometría de flujo. Adaptado de Cotinot et al., (1993)



Los espermatozoides son marcados con un colorante vital fluorescente (Hoechst 33342). Este colorante marca específicamente el ADN y la fluorescencia emitida por cada cromosoma es proporcional a su tamaño. Los espermatozoides que poseen el cromosoma X emiten una señal mayor que aquellos que poseen un Y. La fluorescencia emitida por un único espermatozoide es detectada por la

citometría de flujo. Un rayo láser excita el fluorocromo emitiendo luz. La intensidad de la fluorescencia emitida es medida por un detector específico. La información es enviada a una computadora que analiza los datos. En base a la información recibida los espermatozoides son separados en dos poblaciones. (Palma, 2001).

Los primeros intentos de separación de espermatozoides en especies mamíferas no tuvieron éxito. La separación de espermatozoides X o Y a través de esta técnica fue lograda en 1987 en la especie Chinchilla laniger, con una exactitud del 95% de cada fracción. En esta especie la diferencia de contenido de ADN entre espermatozoides X e Y es de 7,5%. Luego en 1989, Johnson et al., separaron las fracciones X e Y de los espermatozoides de conejos. En esta especie la diferencia de contenido de ADN es de 3%. Las fracciones de espermatozoides X e Y fueron utilizadas para la inseminación artificial, obteniéndose 94% de hembras y 81% de machos (Johnson et al., 1989)

#### *Diferencias de densidad*

Las técnicas incluyen métodos de centrifugación de los espermatozoides y se basan en la diferencia de densidad entre las dos poblaciones de espermatozoides. Para separar espermatozoides X e Y por medio de centrifugación en gradiente de densidad se utiliza Ficoll-sodio-metrisoato o Percoll (Iizuka et al., 1987).

Kaneko et al., en 1984 observaron en la especie humana que cuando los espermatozoides fueron colocados en una solución con 76,7% de Percoll y ultracentrifugados a 30000 g durante 20 minutos, la velocidad de sedimentación del espermatozoide X fue mayor que la del espermatozoide Y. Iizuka et al., (1987) reportó que los gradientes discontinuos de Percoll, pueden ser usados clínicamente para la preselección del sexo femenino. El trabajo consistió en preparar 12 gradientes o columnas de diferentes concentraciones de Percoll (25% a 80%, variando en 5% la concentración), y luego centrifugar la muestra a 250g durante 30 minutos. El resultado indicó que cerca del 94% de los espermatozoides del sedimento eran portadores del cromosoma X. Iizuka reportó el nacimiento de 6 mujeres en 6 embarazos.

En bovinos, Schwiderski et al., (1991) utilizaron una metodología semejante a la reportada por Iizuka, y obtuvieron una exactitud de 74,8% en la separación de los espermatozoides bovinos portadores del cromosoma X. El gradiente consistió en 10 capas de 0,6 ml. de soluciones de Percoll, con densidades que fueron entre 1,034 g/ml a 1,068 g/ml. La velocidad de centrifugación fue 500 g durante 10 minutos. Wolf et al., (2008) reportaron una desviación de 51,35% en hembras y 48,65% en machos utilizando un gradiente de 90 y 45% de Percoll.

En la Tabla 3 se resumen las ventajas y desventajas del método de densidad por gradientes.

**Tabla 3.** Ventajas y desventajas de densidad de gradientes (Henkel et al., 2003)

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Generalmente se recupera una fracción limpia de espermatozoides con gran motilidad	La producción de interfaces de buena relación entre los diferentes medios lleva mayor tiempo.
Espermatozoides de eyaculados de baja concentración pueden ser utilizados	Mayor costo
Alto recupero	Riesgo potencial de endotoxinas
Eliminación de leucocitos	Percoll no puede ser utilizado para FIV/ICSI
Se reduce la reacción ROS	

El perfeccionamiento del método de centrifugación en gradiente de Percoll, podría tener una aplicación en comercial en el sexado de espermatozoides.

Otra técnica de interés basada en gradientes fue introducida en 1973 por Ericsson. Reportó que se podía enriquecer espermatozoides Y a través del pasaje de los espermatozoides por gradientes discontinuos de albúmina humana (Flaherty, S.P y Mattehws, C.D., 1996). Sin embargo esta técnica ha sido muy controvertida desde un principio. Además el método fue patentado y el uso ha

sido limitado a los centros bajo licencia de Gametrics Ltd. (Alzada, MT, USA), por lo que ha resultado difícil para investigadores independientes replicar este método.

### **Objetivos**

El objetivo de este trabajo experimental es aplicar dos técnicas de purificado de espermatozoides (Swim-up y Percoll) al eyaculado y evaluar si estos tratamientos logran modificar la proporción de espermatozoides portadores X e Y, y de ésta forma dirigir los nacimientos hacia un producto deseado.

### **Materiales y Métodos**

El ensayo fue llevado a cabo en un criadero industrial de conejos ubicado en la localidad de San Antonio de Areco, Provincia de Buenos Aires y en el Laboratorio de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Católica Argentina. El criadero se encuentra dividido en dos sectores:

- 1) Maternidad: sector donde nacen los gazapos, hasta los 35 días de edad en cual se produce el destete.
- 2) Engorde: desde el destete hasta los 70-80 días de vida.

Para este ensayo se utilizaron cuatro machos híbridos, entrenados para saltar mediante vagina artificial sólida. Los animales fueron ubicados en jaulas polivalentes (Extrona), alimentados con ración balanceada de acuerdo a los requerimientos nutricionales de su categoría, y tuvieron, en promedio, 16 horas luz/día.

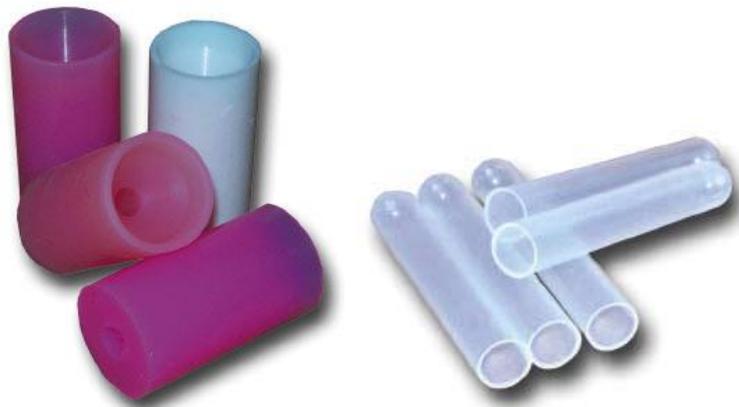
El material para realizar la I.A. en conejos puede clasificarse en:

- Material para extracción de semen
- Material de valoración, dilución y conservación
- Material de inseminación propiamente dicho.

La extracción del semen fue realizada mediante vagina sólida artificial (Fig. 2.) mantenida en estufa a 80°C, para lograr una temperatura de extracción de 42°C al

momento de la recolección de semen. Si la temperatura supera los 42°C, el macho orinará en la vagina o simplemente no eyaculará, produciéndose lesiones en el pene. Y si la temperatura está por debajo, no existirá suficiente estímulo térmico y el conejo no eyaculará (Albariño, 1993). La extracción del semen, al igual que en la monta natural, fue realizada en la jaula del macho, ya que el macho marca su territorio y no presenta rechazo alguno en la operación.

**Figura 2.** Vagina y tubos de extracción utilizados para la extracción de semen



Para que el macho salte y eyacule se utilizaron conejas en celo introducidas en la jaula del macho para estimular la cópula. Una vez recolectado el semen, la muestra fue mantenida en bloques térmicos (37°C) hasta su evaluación en el laboratorio (lapso menor a 5 minutos).

#### *Tratamiento Control*

Se utilizaron cuatro machos híbridos, entrenados para saltar mediante vagina sólida (silicona) artificial unida a tubos colectores plásticos con marcas para la determinación del volumen eyaculado. Los eyaculados obtenidos fueron evaluados macroscópicamente y microscópicamente.

Evaluación macroscópica:

- color del eyaculado
- volumen del eyaculado
- presencia de gel o tapón mucoso

Dado que el color ideal es blanco nacarado (manual Magapor), cualquier otro color fue eliminado debido a sospecha de presencia de orina (amarillo) o sangre (rojo). En caso de tener tapón mucoso, este fue retirado del eyaculado inmediatamente con el objetivo de eliminar efectos aglutinantes en la muestra. Posteriormente cada eyaculado fue diluido 1:2 con un diluyente comercial para conejos (Kutrov<sup>®</sup>, Ladiprevet, Argentina), y se realizó el análisis microscópico:

- Motilidad individual progresiva (MIP)
- % espermatozoides vivos
- Concentración (N°. espermatozoides/ml)

La MIP fue realizada en un microscopio Nikon Eclipse e200 con un objetivo de 40x, observándose movimiento progresivo rectilíneo de los espermatozoides y asignándose una valoración en una escala 1 a 5, Tabla 4. Solo las muestras que obtuvieron una MIP 3 o mayor fueron seleccionadas para las dosis heteroespermáticas.

**Tabla 4.** Escala MIP

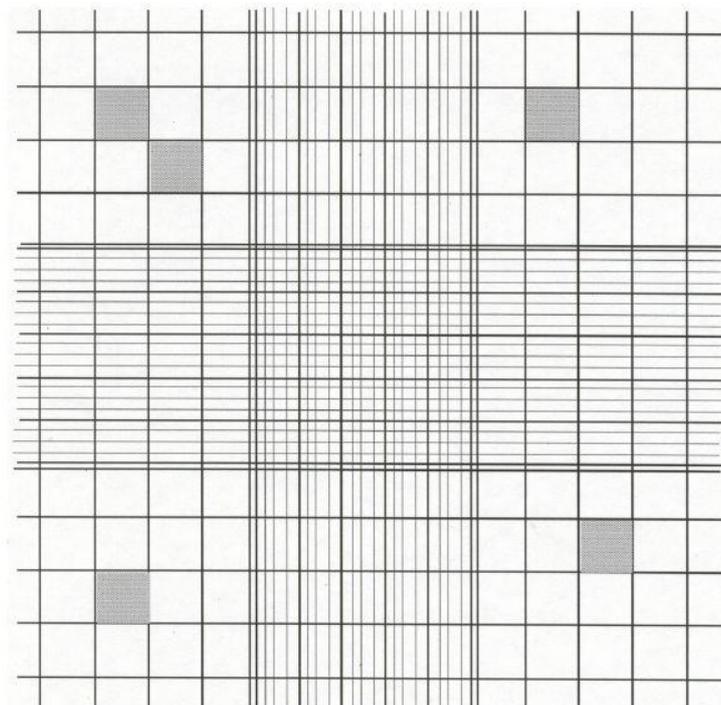
<b>Escala</b>	<b>% Espermatozoides con Motilidad Progresiva</b>
0	0%
0,5	1-10%
1	11-20%
1,5	21-30%
2	31-40%
2,5	41-50%
3	51-60%
3,5	61-70%
4	71-80%
4,5	81-90%
5	91-100%

Fuente: Manual Magapor

El porcentaje de espermatozoides vivos fue determinado mediante la observación de la muestra a 20x. Aquellas muestras con % espermatozoides vivos < a 60 fueron rechazadas. La concentración espermática fue calculada usando una cámara de Neubauer previa dilución 1:400 (5 µl de semen en 2 ml de agua), y contando los espermatozoides con un objetivo de 40x. La concentración de espermatozoides/ml se calculó multiplicando la suma de los espermatozoides contados en los cinco cuadrados (Fig. 3) por 12.800.00

<p>Dilución 1:400</p> $\text{Esp/ml} = \frac{\text{Suma de esp.} \times 0.1 \text{ mm}^3 \times 10.000 \text{ ml/mm}^3 \times 400 \times 16}{5}$ $\text{Esp/ml} = \text{Suma de esp.} \times 12.800.000$
--

**Figura 3.** Diagrama Cámara de Neubauer (Cueto et al., 1993)



Una vez realizada la evaluación macroscópica y microscópica se procedió a realizar el pool heterospermático de los eyaculados. Es importante destacar que durante todo el experimento (control y tratamiento) se utilizaron los mismos 4 machos para realizar los pools de eyaculados.

Seguidamente, se prepararon cánulas de inseminación con una dosis (recomendada) de 30-35 millones de espermatozoides/ml. Sólo se inseminaron hembras con vulva de color rojo ya que presentan mayor tasa de fertilidad con una dosis inseminante de 0,5 ml/ hembra, seguido de 20 µgr GnRH i.m./animal a fin de desencadenar la ovulación. En el momento del parto, se mantuvo registro del número de días de gestación para cada hembra, la cantidad de animales nacidos vivos y muertos. A los 35 días de vida, los animales fueron pesados y sexados por observación visual de los órganos genitales según procedimiento estándar.

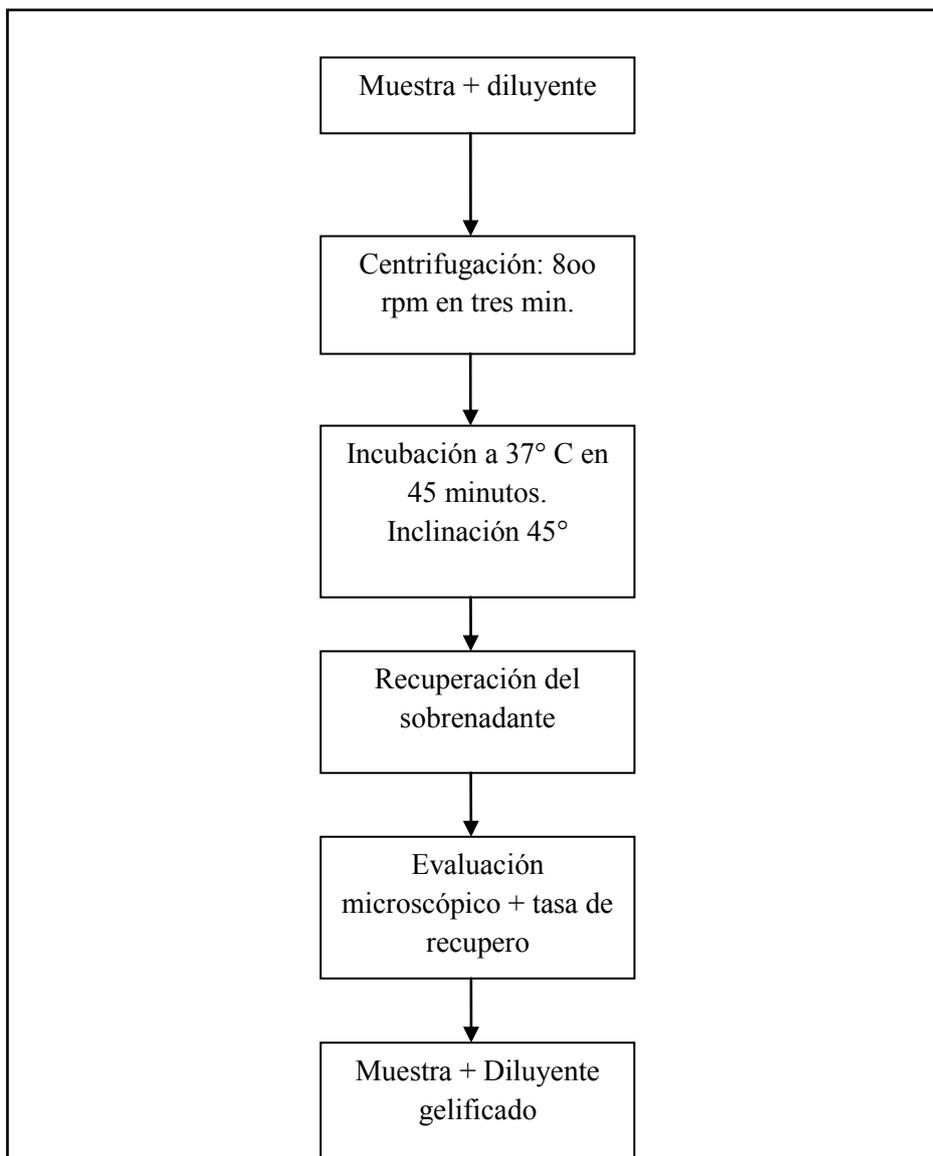
#### *Técnica Swim-Up*

Con esta técnica de migración de los espermatozoides se trató de obtener la separación de espermatozoides “Y” del eyaculado.

La obtención, valoración, obtención de pool heterospermático de los eyaculados fue realizado según el procedimiento descrito en el tratamiento control. La muestra fue centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5403) por 3 minutos, a 800 rpm (3 G). Luego de la centrifugación, la muestra fue colocada en estufa a 37°C por 45 minutos con una inclinación de 45° para facilitar la migración ascendente de los espermatozoides móviles

Transcurrido el tiempo, se tomaron 15 µl. y se observó al microscopio. Se evaluó nuevamente MIP y la concentración luego de la migración por Swim-up. Una vez aprobada la muestra, se aspiró nuevamente de la parte superior del tubo, una pequeña fracción, y la misma fue resuspendida en un diluyente gelificante a 19°C, a fin de facilitar el transporte desde el laboratorio hasta el criadero. A continuación se muestra el Esquema 1, en donde se puede observar la técnica de Swim-Up.

### Esquema 1. Técnica Swim-up



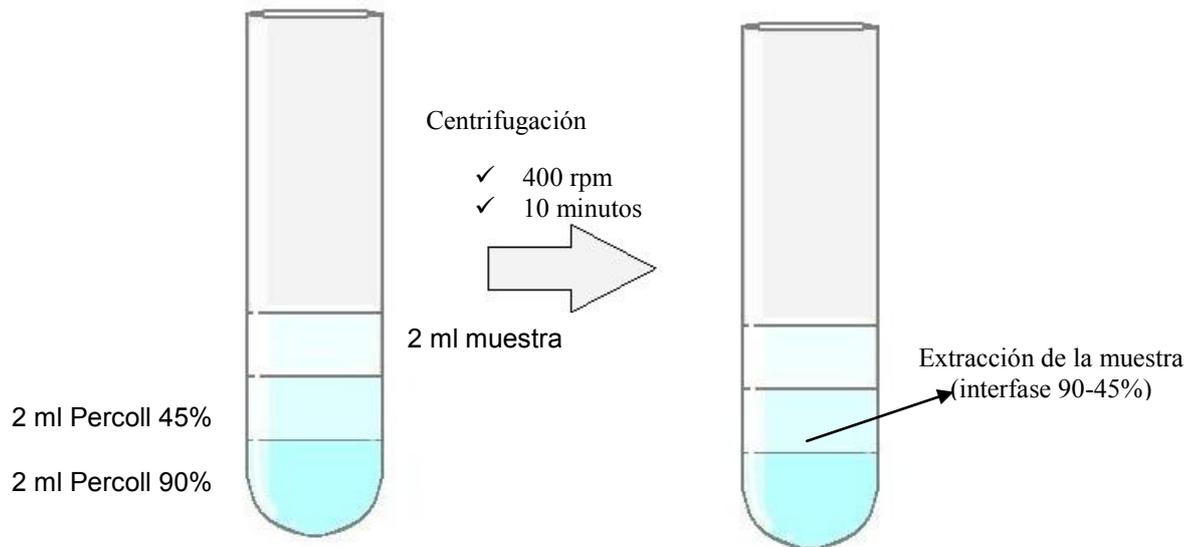
La inseminación de las bandas se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito para el control. En el momento del parto, se mantuvo registro del número de días de gestación para cada hembra, la cantidad de animales nacidos vivos y muertos. A los 35 días de vida, los animales fueron pesados y sexados por observación visual de los órganos genitales según procedimiento estándar.

#### *Técnica con gradientes – Percoll*

Para obtener la separación de espermatozoides X, se trabajó con gradientes de Percoll® (Sigma P1644.) de 45 y 90 %. Se prepararon las columnas colocando

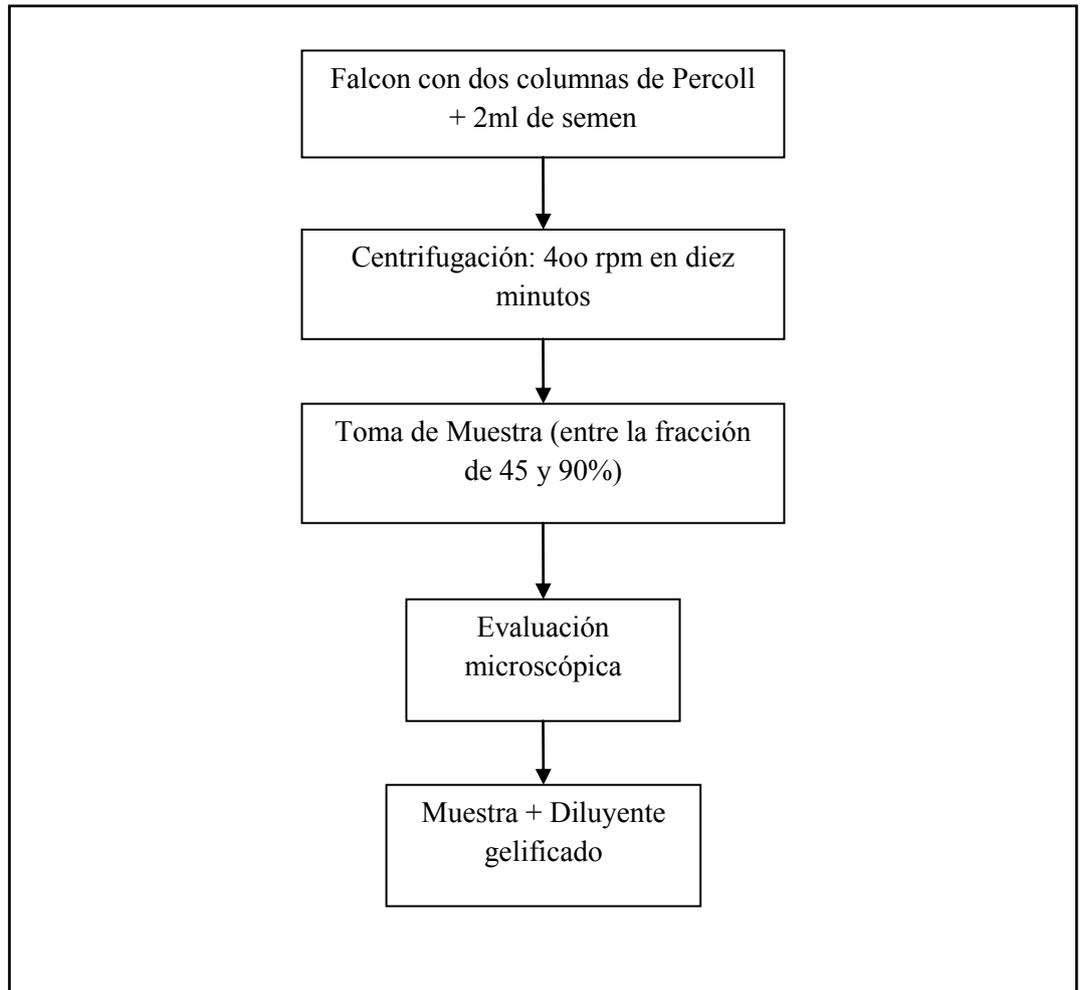
2 ml de Percoll al 90%) preparado en diluyente Kutrov en el fondo de un tubo plástico cónico de 15 ml. (Falcon), sobre esta fase se colocó suavemente 2 ml de Percoll al 45% (Fig.4) y se mantuvo en baño termostático a 37°C. Sobre la columna de gradientes preparada se agregaron 2 ml de la muestra heterospermática de semen, formándose tres capas visibles (Figura 4).

**Figura 4.** Armado de las columnas de Percoll.



Por último se colocó la columna con la muestra en la centrifuga por 10 minutos a 400 rpm. Transcurrido el tiempo, fue tomada una muestra de entre las fracciones de 90 y 45%, y se analizó la MIP, y la concentración. Se armaron las cánulas con la dosis recomendada, y se inseminó la banda de hembras.

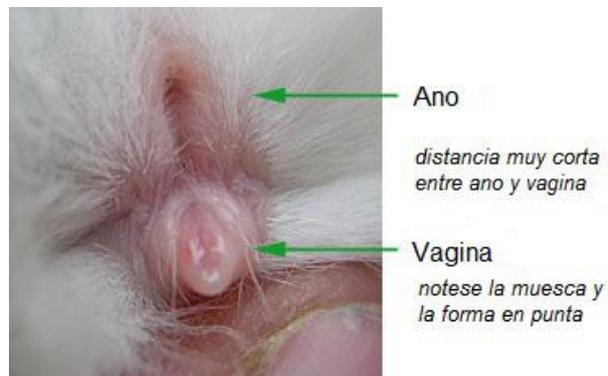
## Esquema 2. Técnica Percoll



## Sexado de los Gazapos

A los 35 días de vida se sexaron los gazapos nacidos por observación visual de órganos genitales (Figura 5).

**Figura 5.** Visualización de los sexos a los 30 días de vida



Fuente: <http://www.rabbit-guide.com>

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza, seguido de una prueba de Tukey evaluando el grado de significación para  $p < 0,01$ . Para este análisis se empleó el programa InfoStat versión 2010e.

## Resultados

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de machos y hembras nacidos vivos entre tratamientos ( $p < 0.01$ ). La cantidad de animales nacidos por tratamiento se resumen en la Tabla N° 5.

**Tabla 5.** Nacidos vivos totales, % de machos, % de hembras y peso al destete para cada tratamiento.

Tratamiento	NV	No. (%) hembras	No. (%) machos	Peso al destete (gr)
Control	180	91 (50,56) <sup>a</sup>	89 (49,44) <sup>a</sup>	859,4 <sup>a</sup>
Swim up	171	62 (36,26) <sup>b</sup>	109 (63,74) <sup>b</sup>	822,1 <sup>a</sup>
Percoll	185	125 (67,57) <sup>c</sup>	60 (32,43) <sup>c</sup>	855,4 <sup>a</sup>

Las letras diferentes entre columna indica diferencias significativas,  $p < 0.01$  (Anova, Tukey)

A continuación se presenta la Tabla N°6, en donde se muestra el promedio de las características de las variables %Machos, nacidos vivos (NV) totales y peso al destete (a los 35 días) para los tres tratamientos.

**Tabla 6.** Promedio de las variables % machos, peso al destete y nacidos vivos totales para cada tratamiento

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mediana
Control	% Machos	30	49,06	21,20	50,00
Control	NV Totales	30	6,00	0,95	6,00
Control	Peso al Destete	30	859,43	65,30	882,00
Percoll	% Machos	27	32,63	11,46	28,57
Percoll	NV Totales	27	6,85	0,72	7,00
Percoll	Peso al Destete	27	855,41	57,66	846,00
Swim-Up	% Machos	21	64,22	6,40	63,64
Swim-Up	NV Totales	21	8,14	1,56	9,00
Swim-Up	Peso al Destete	21	822,10	93,18	851,00

Para el tratamiento Swim-up, de 171 animales nacidos vivos, el 63,74% (109) resultaron ser machos. El tratamiento Percoll resultó en 185 animales nacidos vivos, de los cuales 60 (32,43%) resultaron machos, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.01$ ).

A continuación se muestra el análisis de la varianza correspondiente y Test de Tukey ( $\alpha = 0,01$ ) para cada tratamiento en el porcentaje de machos.

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% Machos	78	0,41	0,39	31,97

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11918,10	2	5959,05	25,89	<0,0001
Tratamiento	11918,10	2	5959,05	25,89	<0,0001
Error	17264,90	75	230,20		
Total	29183,01	77			

#### Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=12,71519

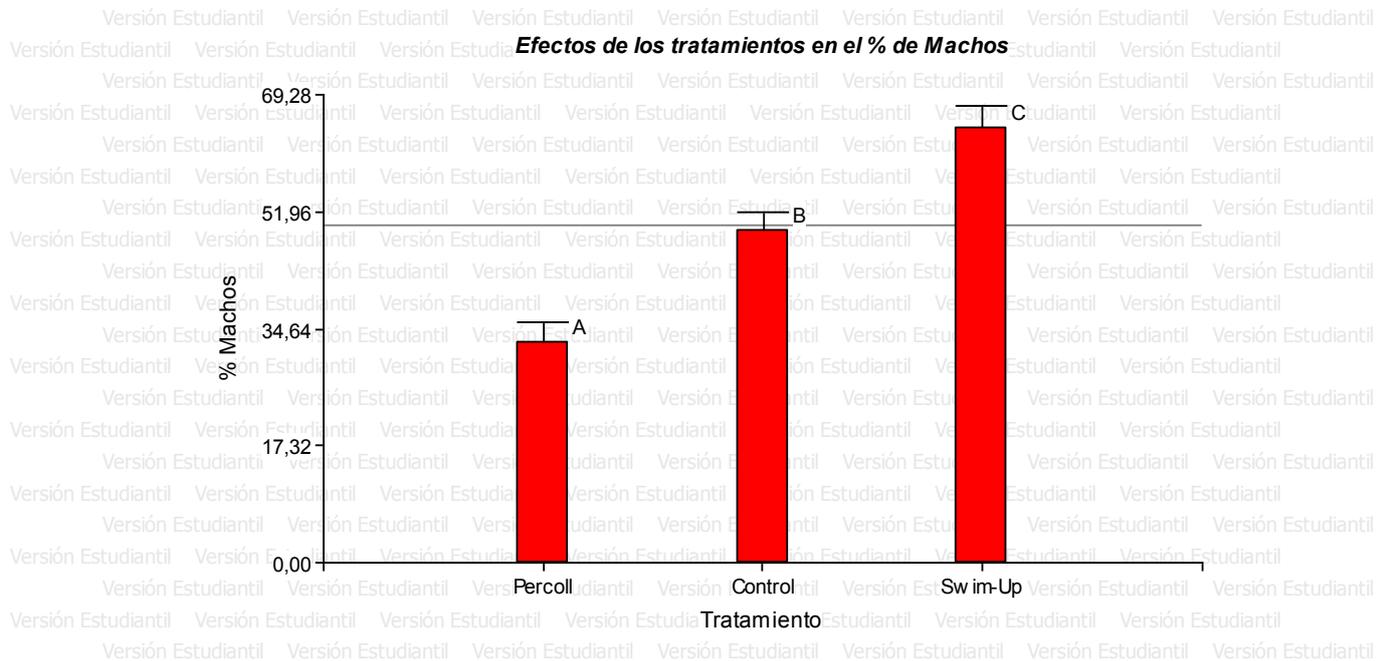
Error: 230,1987 gl: 75

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Percoll	32,63	27	2,92	A
Control	49,06	30	2,77	B
Swim-Up	64,22	21	3,31	C

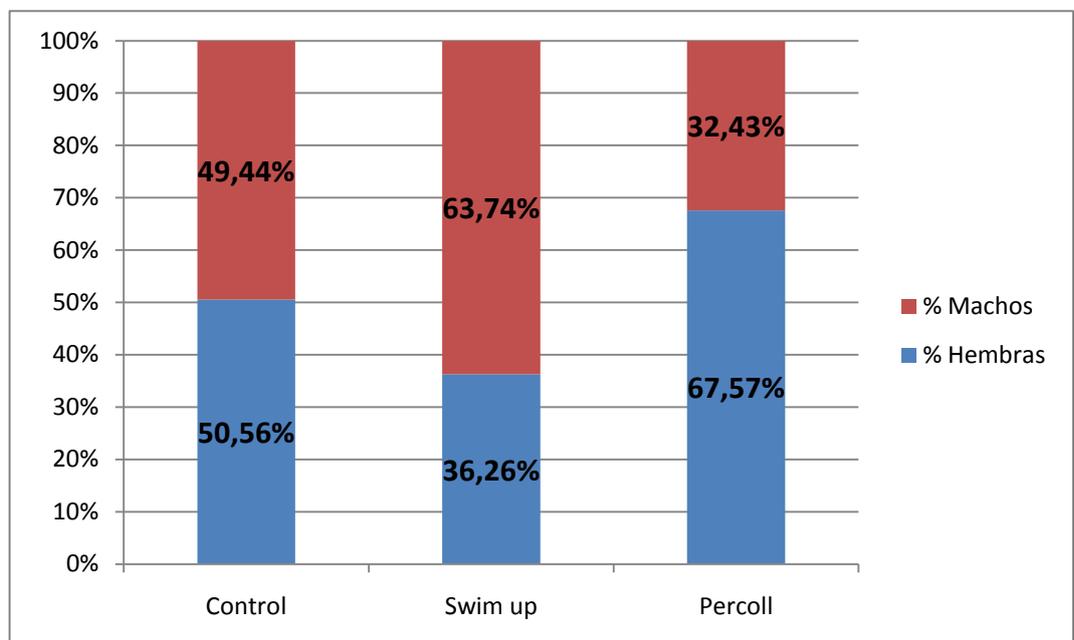
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ )

Como se puede observar en el Test de Tukey, existen diferencias significativas entre los tratamientos en la variable porcentaje de machos. Como se puede observar en la Figura 6 el tratamiento Swim-up es el que mejor logra “separar” o dirigir los espermatozoides portadores del cromosoma Y. En cambio el tratamiento Percoll, fue el que menor porcentaje de machos obtuvo, tan solo un 32,43%. Como era de esperar el tratamiento control llegó a porcentajes cercanos al 50% de machos.

**Figura 6.** Gráfico de barras, efectos de los tratamientos en el porcentaje de machos.



**Figura 7.** Gráfico de barras, porcentaje de machos y hembras logrados en cada tratamiento



Además, se analizó estadísticamente si se encontraron diferencias significativas en cuanto al Peso al Destete de cada tratamiento a los 35 días de

edad. A continuación se muestra el análisis de la varianza correspondiente y Test de Tukey con un  $\alpha = 0,01$  para cada tratamiento para la variable peso al destete.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso al Destete	78	0,05	0,02	8,44

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19495,29	2	9747,65	1,91	0,1559
Tratamiento	19495,29	2	9747,65	1,91	0,1559
Error	383737,69	75	5116,50		
Total	403232,99	77			

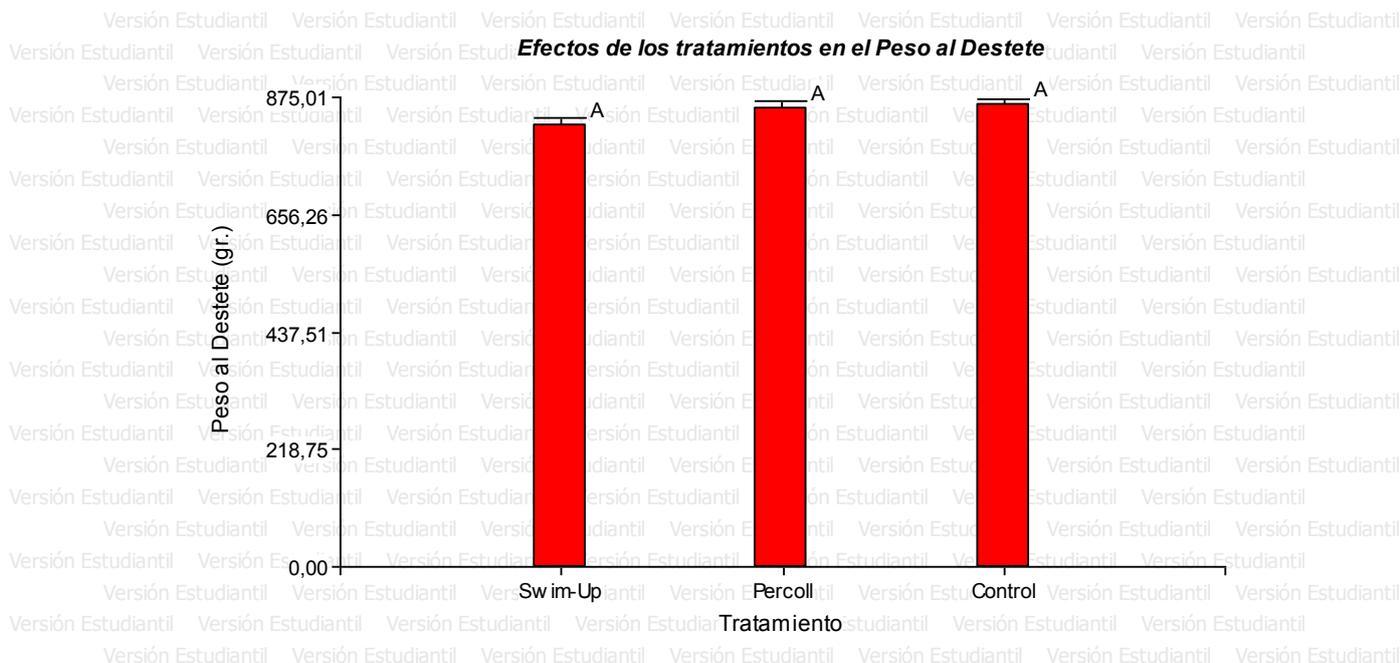
**Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=59,94571**

Error: 5116,5026 gl: 75

Tratamiento	Medias	n	E.E.
Swim-Up	822,10	21	15,61 A
Percoll	855,41	27	13,77 A
Control	859,43	30	13,06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ )

**Figura 8.** Gráfico de barras, peso al destete (gr) a los 35 días de edad según cada tratamiento.



Como se puede observar en el Test de Tukey anterior, y en la Figura 8 no existen diferencias significativas en cuanto a que los tratamientos Percoll y Swim-up generen gazapos de menor tamaño que el del tratamiento control, dando muy buenos pesos al destete.

### **Discusión**

En la especie cunícola no existe evidencia en la literatura de la utilización de Swim-up para enriquecer la tasa de nacimientos hacia un sexo determinado. Nuestro ensayo tuvo, con el tratamiento Swim-up, un porcentaje de separación hacia machos de 63,74%. Es de destacar que un estudio similar reportado por Hernández P.J.E. et al., (2008) con separación por gradientes de densidad de albúmina sérica humana obtuvo, sobre un total de 30 partos luego de inseminación artificial con espermatozoides obtenidos de la capa con 20% de HSA, resultaron machos el 72,72% de los nacidos (187 gazapos). Esto significó una diferencia obtenida entre ambos métodos del 8,98% a favor del método de gradientes de densidad de albúmina. Otro autor Zavos, P.M. (1985) también reportó gradientes de densidad de albúmina en conejos, obteniendo el 55,3% de machos. En la especie bovina, Wolf et al., (2008) utilizó Swim-up y Percoll para la producción in vitro de embriones. Con Swim-up reportaron, de un total de 142 embriones bovinos, un 58,43% (83) machos. Utilizando Percoll (columnas de 90 y 45%), de un total de 185 embriones, el 51,35% (95) eran hembras.

A su vez, tampoco se han encontrado en la literatura reportes de la utilización de Percoll para el enriquecimiento de la fracción de espermatozoides. En nuestro trabajo, el tratamiento con Percoll arrojó un porcentaje de producción de hembras de 67,57%, siendo este porcentaje superior a aquel reportado con el mismo tratamiento por Wolf et al., (2008) para la especie bovina, si bien la diferencia del contenido de ADN es mayor en bovinos que en conejos (3,8 vs 3,0%).

En humanos, Iizuka et al., (1987) reportaron que el 94% de los espermatozoides del sedimento eran portadores del cromosoma X cuando el lavado de eyaculado se realizaba con Percoll. Sin embargo, debe destacarse que

tanto en el trabajo reportado por Wolf et al., como por Iizuka et al., el diseño experimental fue deficiente, careciendo ambos estudio de apropiados controles que indicaran la distribución normal de nacimientos en las poblaciones estudiadas. Además, debe considerarse el hecho de que los estudios realizados en humanos son conducidos en clínicas de reproducción asistida, donde la población de donantes es considerada subfertil o infértil

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que el tratamiento de Percoll podría favorecer la proporción de los nacimientos hacia las hembras; en tanto el tratamiento de Swim-up lo haría hacia la producción de machos. Estos resultados podrían extrapolarse a otras especies zootécnicas de interés, o especies con mayores diferencias (chichilla, porcinos, etc.) entre los contenidos de ADN de los espermatozoides portadores de cromosoma X o Y.

## Conclusiones

- La inseminación de las hembras con pool heterospermático de 4 machos (control) resultó en una distribución de la progenie de 49,44% machos y 50,56 % hembras, sobre un total de 180 animales sexados.
- El tratamiento de Swim-up obtuvo un porcentaje de 63,74% de progenie macho, esto significó un desvío del 28,92% respecto del control ( $p < 0,01$ ), sobre un total de 171 animales sexados.
- El tratamiento de Percoll obtuvo un porcentaje de 67,57% de progenie hembra, significando esto un desvío del 33,64% respecto del control ( $p < 0,01$ ), sobre un total de 185 animales sexados.
- No se encontraron diferencias significativas en el peso al destete a los 35 días comparándolo con el tratamiento control.
- Los resultados obtenidos indican que es posible, mediante tratamientos de purificación y lavado del eyaculado, modificar la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X e Y, logrando una desviación significativa de la media (50 machos:50 hembras).

## **Anexos**

### *1) Parte estadística*

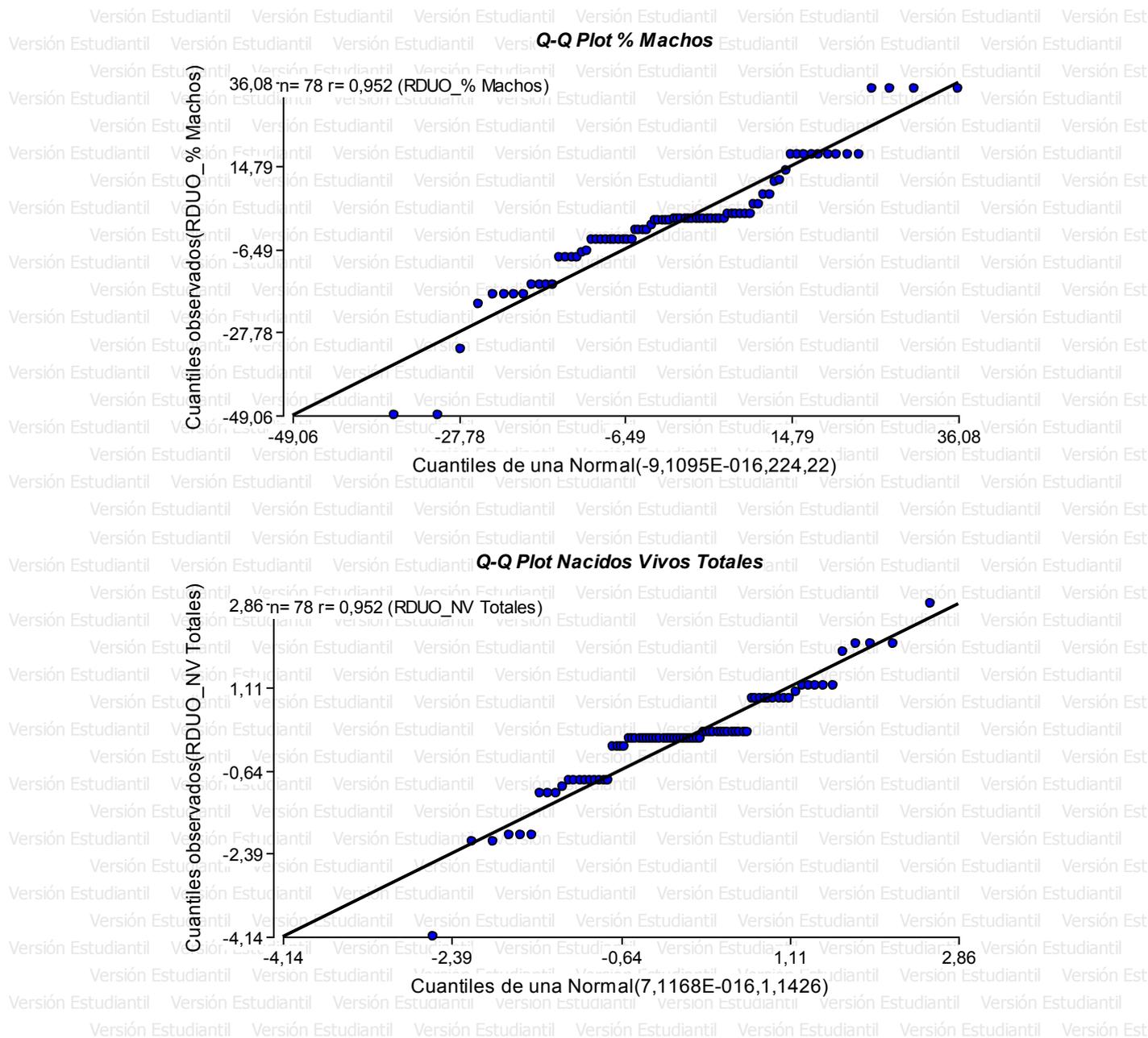
#### **Elementos del diseño experimental**

- Unidad experimental (individuo): cada hembra
- Variable Respuesta: son tres
  - % Machos
  - NV Totales
  - Peso al Destete (34-35 días)
- Variable Explicativa o factor: tratamiento
- Niveles: tres
  - Control
  - Swim-Up
  - Percoll

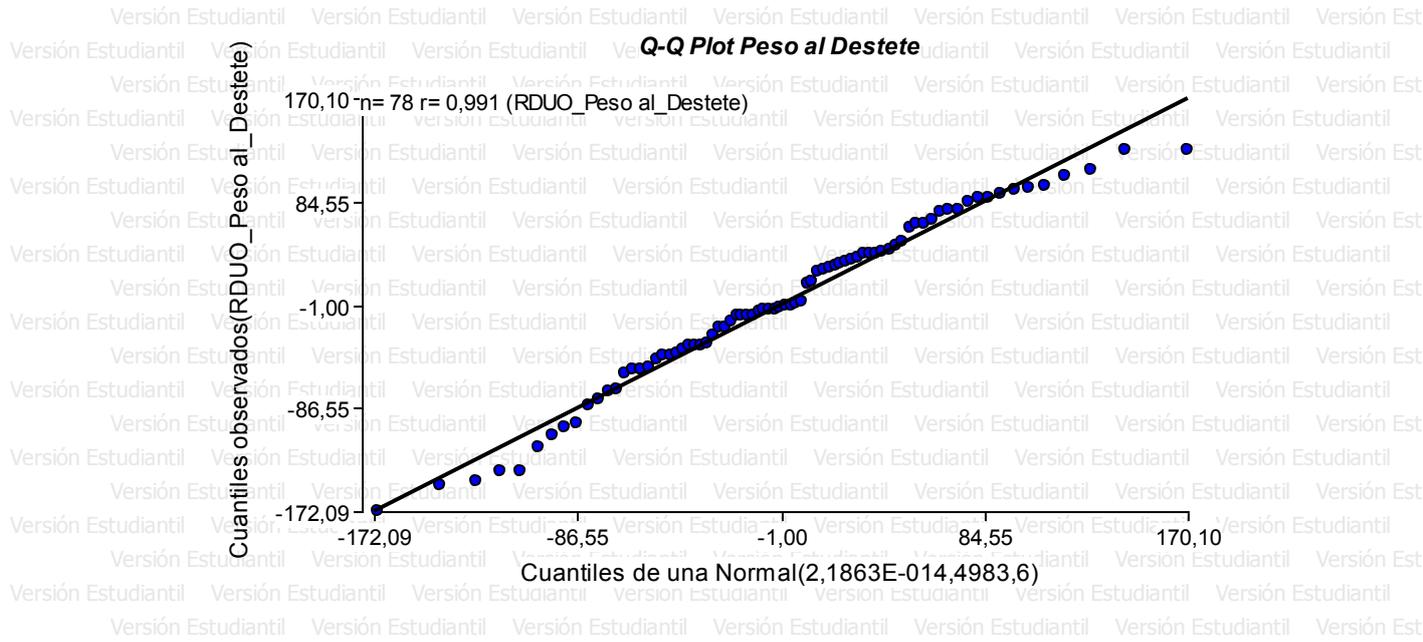
#### **Supuestos**

- Muestras aleatorias e independientes
- Normalidad:

## Gráfico Q-Q Plot

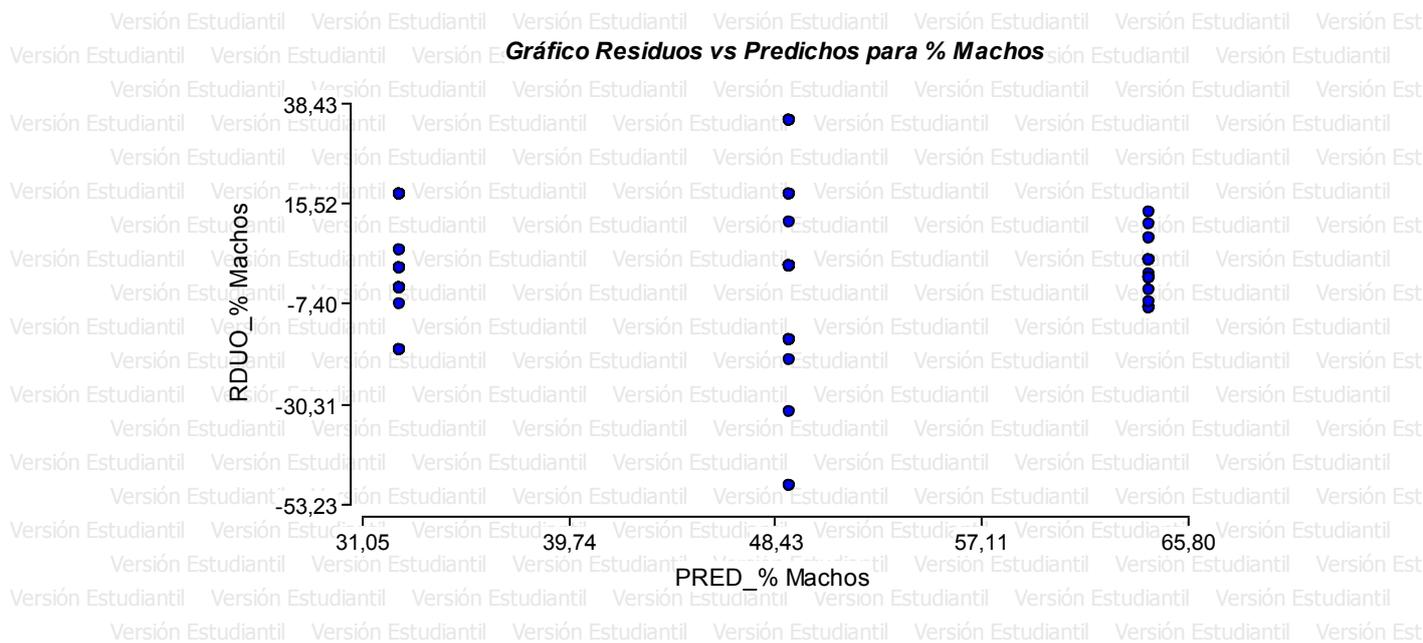


Por lo que se puede observar en los gráficos de Q-Q Plot tanto para la variable % Machos, como para NV Totales podríamos inferir que se trata de poblaciones que no sigan una distribución normal. Pero hay que tener en cuenta que el Anova igualmente es robusto a la falta de normalidad.



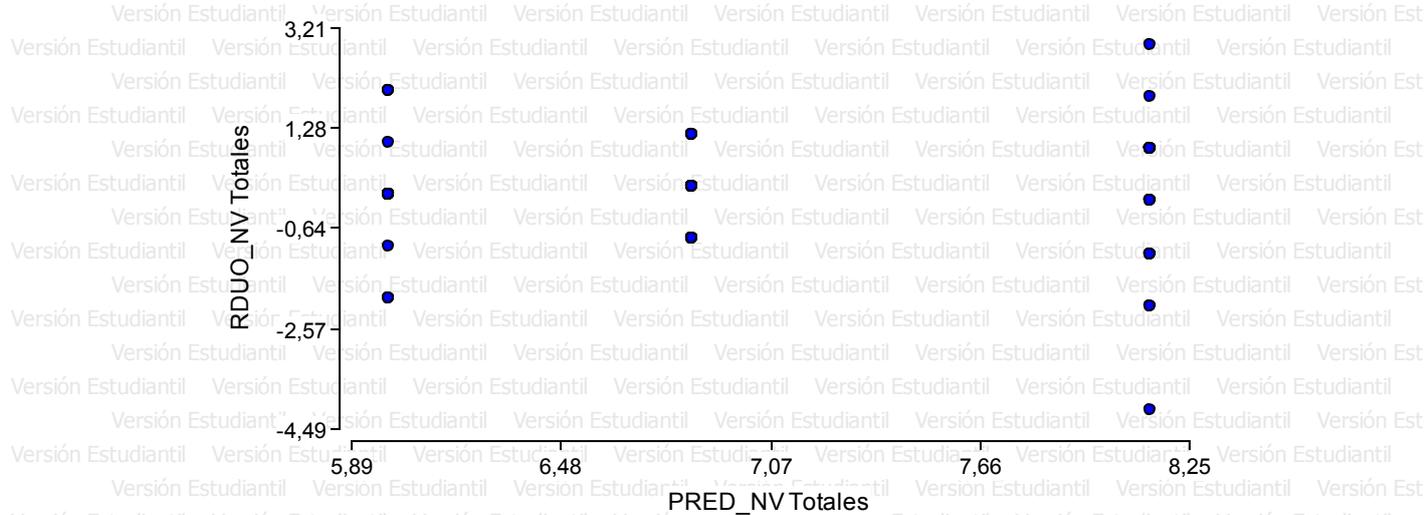
- Homocedasticidad:

**Forma Analítica / Grafico de dispersión: Residuos vs. Predichos**



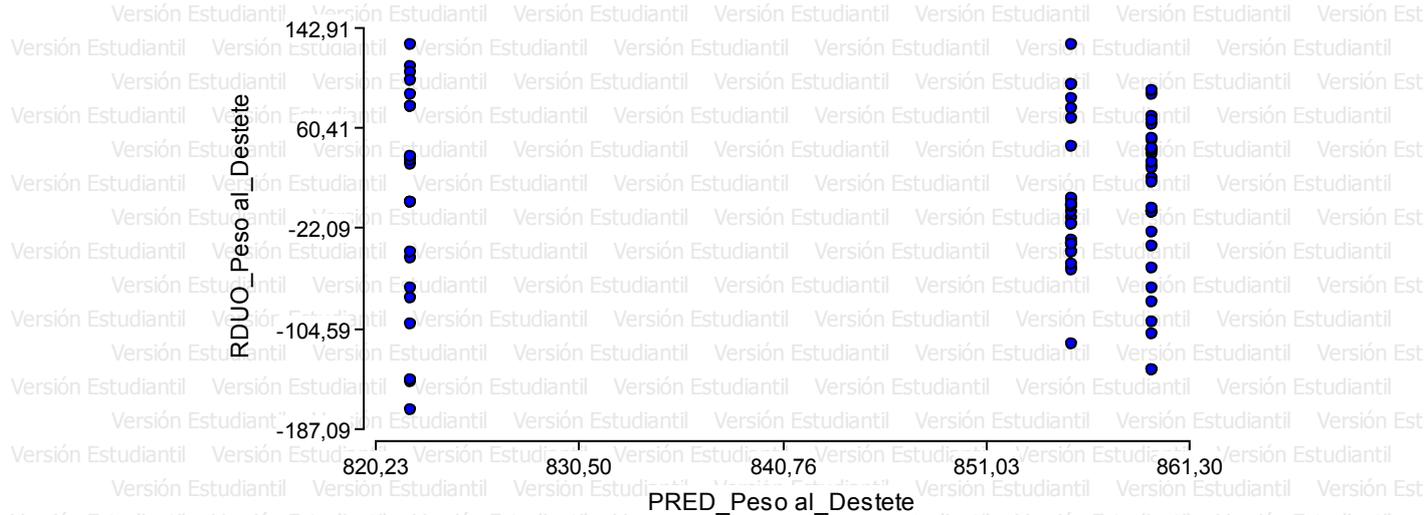
Versión Estudiantil    Versión Estudiantil

**Gráfico Residuos vs Predichos para NV Totales**



Versión Estudiantil    Versión Estudiantil

**Gráfico Residuos vs Predichos para Peso al Destete**



**Prueba de Levene**

*% Machos:*

$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4 = \sigma^2_5 = \sigma^2$      $H_1: \text{algún } \sigma^2_i \neq \sigma^2$

*NV Totales:*

$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4 = \sigma^2_5 = \sigma^2$      $H_1: \text{algún } \sigma^2_i \neq \sigma^2$

*Peso al Destete:*

$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \sigma^2_4 = \sigma^2_5 = \sigma^2$      $H_1: \text{algún } \sigma^2_i \neq \sigma^2$

## **Ho: hay Homocedasticidad**

### **Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS % Machos	78	0,11	0,09	108,34

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1095,77	2	547,88	4,79	0,0110
Tratamiento	1095,77	2	547,88	4,79	<b>0,0110</b>
Error	8573,02	75	114,31		
Total	9668,79	77			

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS NV Totales	78	0,14	0,12	109,39

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,02	2	3,51	6,07	0,0036
Tratamiento	7,02	2	3,51	6,07	<b>0,0036</b>
Error	43,31	75	0,58		
Total	50,33	77			

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Peso al Destete	78	0,11	0,08	70,49

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14287,89	2	7143,95	4,49	0,0145
Tratamiento	14287,89	2	7143,95	4,49	<b>0,0145</b>
Error	119454,60	75	1592,73		
Total	133742,49	77			

	P valor	<	$\alpha = 0,01$	Hay Homocedasticidad
% Machos	0,0110	>	0,01	No rechazo Ho. Hay homocedasticidad
<b>NV Totales</b>	<b>0,0036</b>	<	<b>0,01</b>	<b>Rechazo Ho</b>
Peso Al destete	0,0145	>	0,01	No rechazo Ho. Hay homocedasticidad

Tanto para % Machos, como para Peso al Destete se comprobó que las varianzas son iguales ( $\alpha = 0,01$ ). En cambio para NV totales habría que realizar transformaciones.

## Transformación Raíz Cuadrada para la variable nacidos vivos (NV)

### Análisis de la varianza

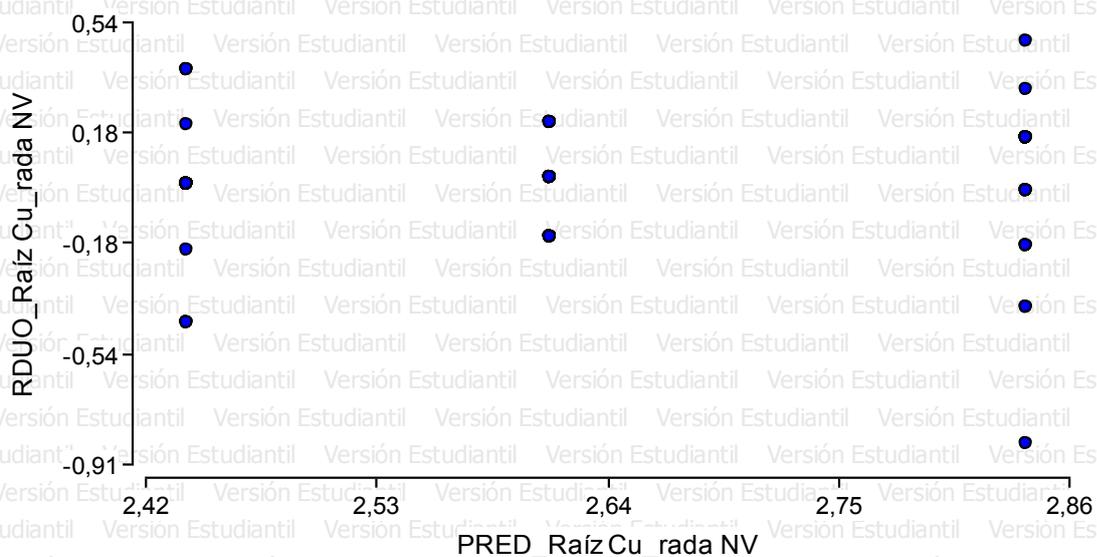
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Raíz Cuadrada NV	78	0,10	0,07	111,46

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,18	2	0,09	3,99	0,0226
Tratamiento	0,18	2	0,09	3,99	0,0226
Error	1,69	75	0,02		
Total	1,87	77			

Luego de la transformación, raíz cuadrada, para la variable NV totales, podemos observar que las varianzas son iguales ( $\alpha = 0,01$ ). A continuación se muestra el gráfico de residuos vs. predichos con la transformación raíz cuadrada para NV.

**Gráfico Residuos vs Predichos para Raíz Cuadrada de NV**



### ANOVA – Tukey (0,01)

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% Machos	78	0,41	0,39	31,97

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11918,10	2	5959,05	25,89	<0,0001
Tratamiento	11918,10	2	5959,05	25,89	<0,0001
Error	17264,90	75	230,20		
Total	29183,01	77			

**Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=12,71519**

Error: 230,1987 gl: 75

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Percoll	32,63	27	2,92	A
Control	49,06	30	2,77	B
Swim-Up	64,22	21	3,31	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ )

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
NV Totales	78	0,39	0,38	15,76

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	56,74	2	28,37	24,18	<0,0001
Tratamiento	56,74	2	28,37	24,18	<0,0001
Error	87,98	75	1,17		
Total	144,72	77			

**Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=0,90767**

Error: 1,1731 gl: 75

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Control	6,00	30	0,20	A
Percoll	6,85	27	0,21	A
Swim-Up	8,14	21	0,24	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ )

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso al Destete	78	0,05	0,02	8,44

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19495,29	2	9747,65	1,91	0,1559
Tratamiento	19495,29	2	9747,65	1,91	0,1559
Error	383737,69	75	5116,50		
Total	403232,99	77			

**Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=59,94571**

Error: 5116,5026 gl: 75

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Swim-Up	822,10	21	15,61	A
Percoll	855,41	27	13,77	A
Control	859,43	30	13,06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ )

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Raíz Cuadrada NV	78	0,37	0,36	8,03

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,95	2	0,98	22,26	<0,0001
Tratamiento	1,95	2	0,98	22,26	<0,0001
Error	3,29	75	0,04		
Total	5,25	77			

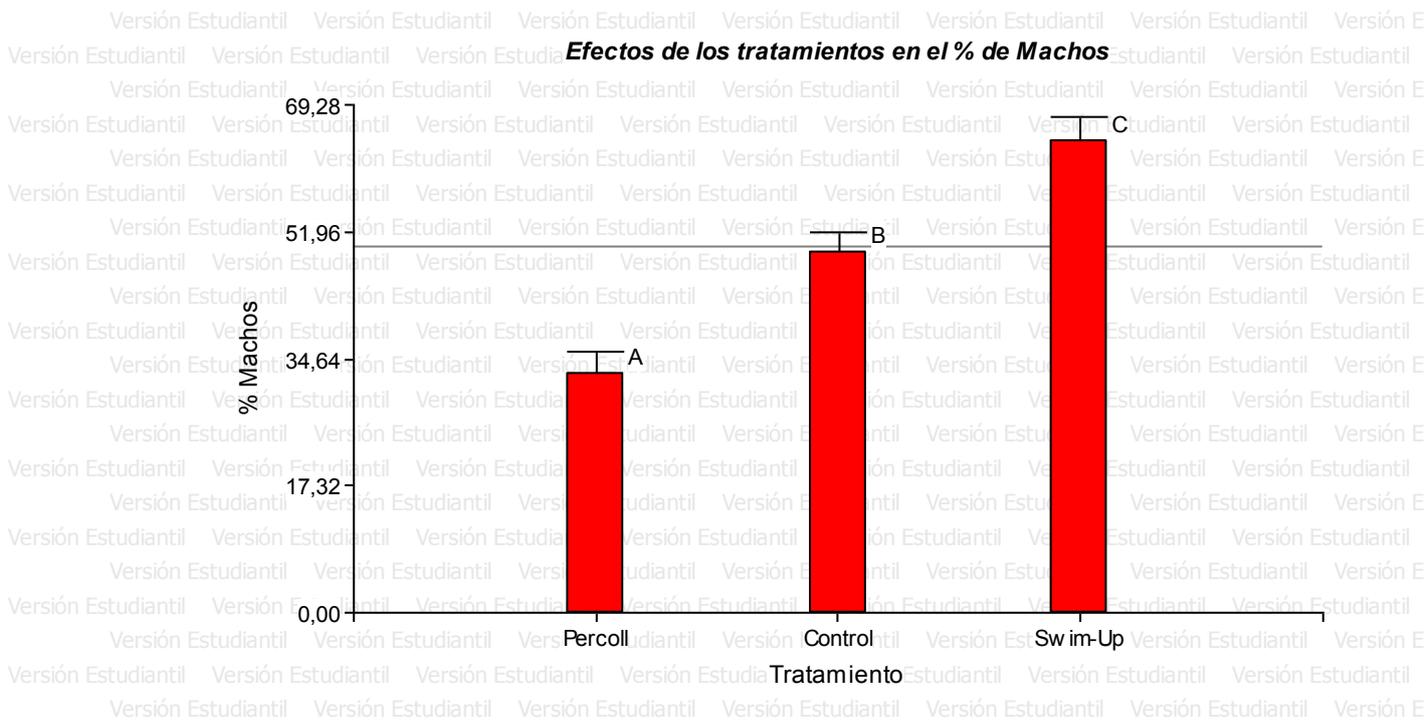
**Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=0,17557**

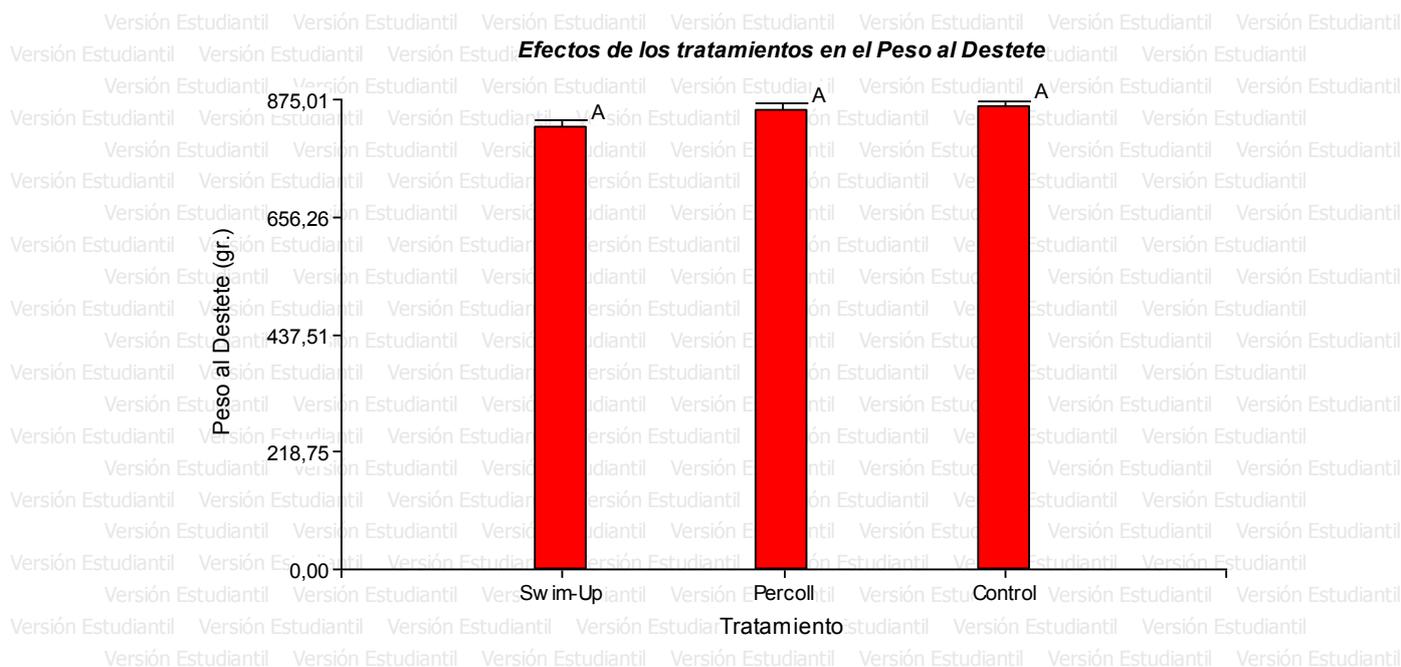
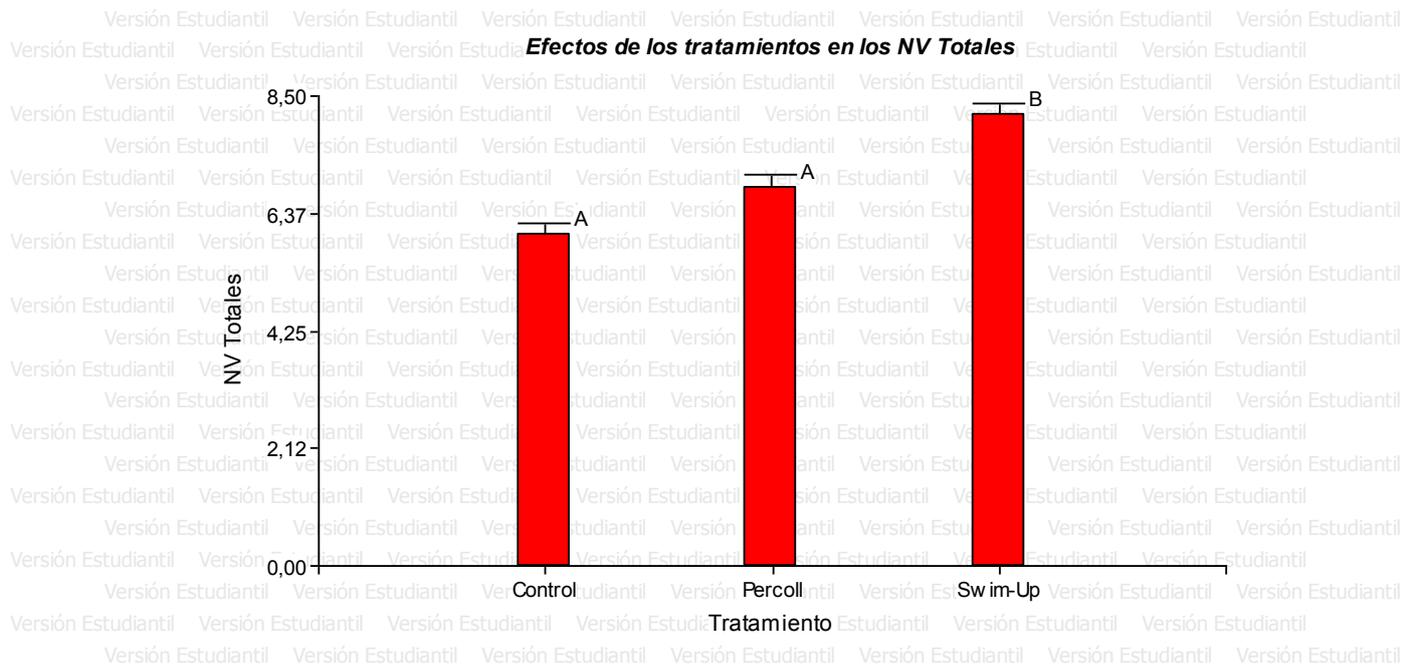
Error: 0,0439 gl: 75

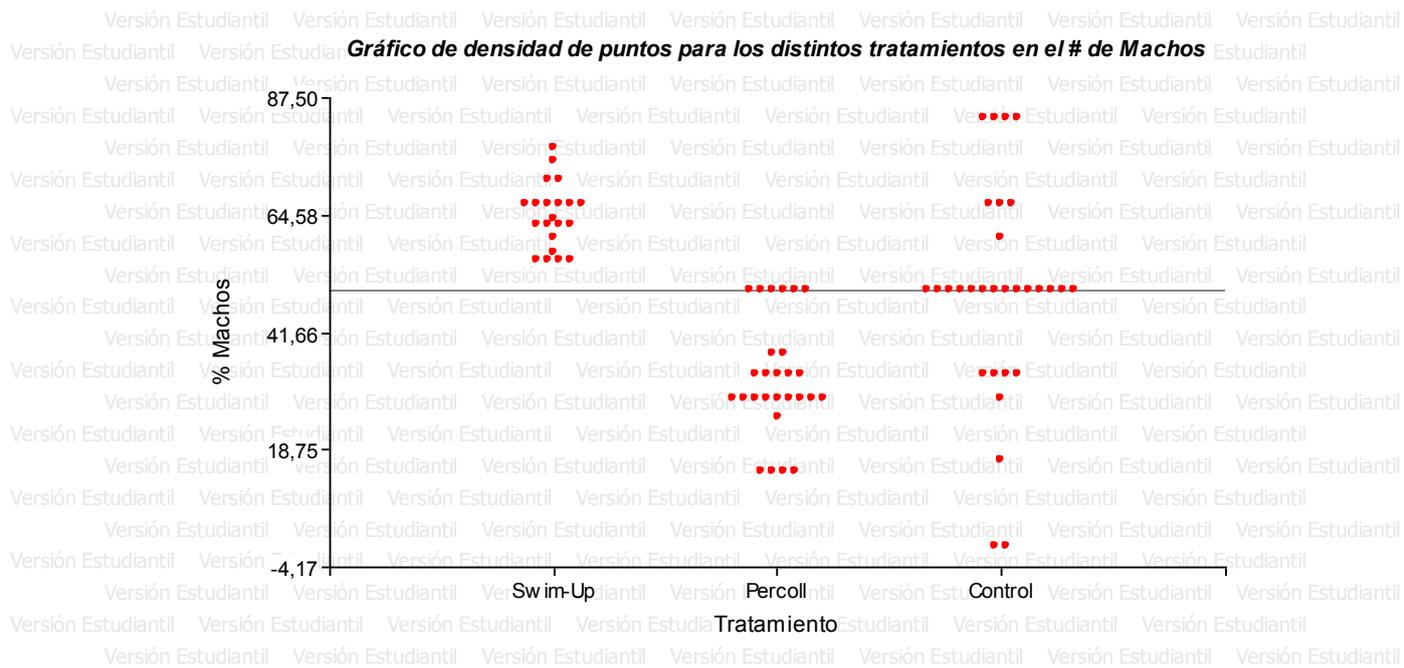
Tratamiento	Medias	n	E.E.
Control	2,44	30	0,04
Percoll	2,61	27	0,04
Swim-Up	2,84	21	0,05

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,01$ )

**Gráficos**







## 2) Fotografías

*Foto N°1: extracción se semen.*



Foto N°2: Muestras de semen.



Foto N°3: bloques calentadores.

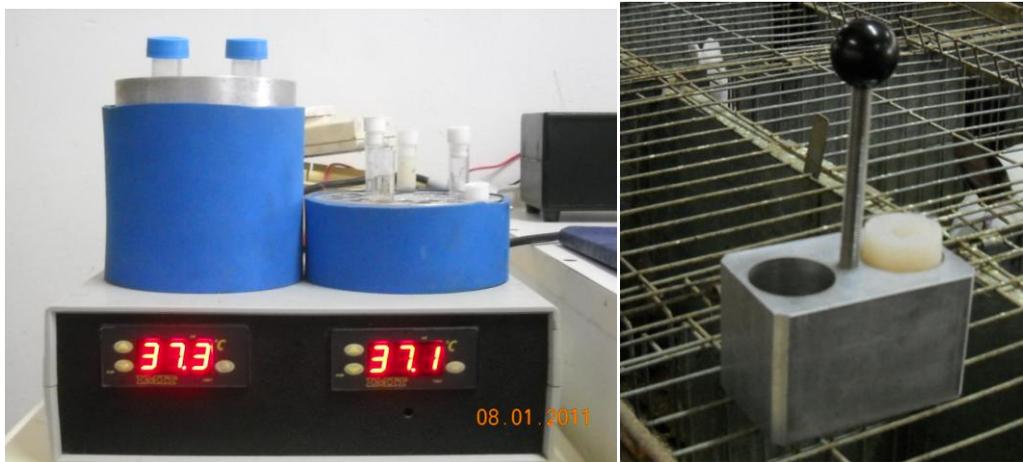


Foto N°4: izquierda análisis microscópico de las muestras. Derecha visualización columna de percoll



*Foto N°5: conteo de espermatozoides*



*Foto N°6: inseminación*



*Foto N°7: partos*



*Foto N°8: gazapos con 11 días de vida*



## **Agradecimientos**

A mi tutora, la Dra. Marina Sansiñena por su acompañamiento, dedicación y consejos dados en estos últimos tres años, y sobre todo en la tesis.

A la Lic. Adriana Pérez, por sus consejos en el armado del diseño experimental y seguimiento estadístico.

Al Dr. Sergio Samus, por la donación de los diluyentes utilizados en este ensayo.

Al Ing. Alejandro Negro de DIPAGA, que me brindó información sobre el tema inseminación artificial en conejos.

Al Dr. Luigi Gualterio por sus aportes técnicos en el tema inseminación artificial.

Al Dr. Hozbor Federico, y la Dra. Luciano Cecilia, ambos integrantes del INTA.

A Facundo Manzi por ayudarme a armar las jaulas utilizadas en la facultad, y a Jorge por la total dedicación en el cuidado de los animales.

A mis queridos padres y hermanos, por el apoyo incondicional y permanente que recibí durante toda mi carrera.

## **Bibliografía**

Alvariño, M.R. (1993) Control de la reproducción en el conejo. España, Ediciones Mundi-Prensa.

Check, J.H., Shanis, B., Cooper, S., Bollendorf, A. (1989). Male sex Preselection following swim-up technique and insemination in women treated with ovulation inducing drugs. Arch. Androl. 23: 165-166.

Cotinot, C., Mcelreavey, K. y Fellous, M. (1993). Sex determination, Paris, 213-226.

Cueto, M., Gibbons, A., García Vinent, Wolff, M. y Arrigo, J. (1993). Obtención, procesamiento del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación técnica de producción animal del INTA Bariloche N° 200.

Flaherty, S.P., Matthews, C.D. (1996). Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. Molecular Human Reproduction 12, vol2: 937-942

Garner, D.L. (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm, Theriogenology 65: 943-957.

Gordon, M.J. (1957). Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa. Proc Nat Acad Sci 43: 913-918.

- Henkel, R.R., y Schill, W.B. (2003) Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 108.
- Hernández, P.J.E., Fernández, R.F., Reyes, C.J., Echegaray, J.L. y Mendoza, B. (2008). Separación de espermatozoides “Y” de eyaculado de conejo por medio de gradientes de densidad de albumina sérica humana. *Salud Animal* 30:45-49.
- Iizuka, R., Kaneko, S., Aoki, R., y Kobayashi, T. (1987) Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application. *Human Reproduction*: 2, 573-575.
- Jafar, S.I., Flint, A.P.F. (1996). Sex selection in mammals: a review. *Theriogenology* 46: 191-200.
- Johnson, L.A. (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art. *Animal Reproduction Science* 60-61: 93-107.
- Johnson, L.A., James, P.F., y Harold, W.H. (1989) Sex Preselection in Rabbits: Live Births from X and Y Sperm Separated by DNA and Cell Sorting. *Biology of Reproduction* 41: 199-203.
- Kaneko, S., Oshio, S., Kobayashi, T., Mohri, H., Iizuka, R. (1984). Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedimentation in Percoll density gradients. *Biomed. Res* 5: 187-194

- Maxwell, W.M.C., Evans, G., Hollinshead, F.K., Bathgate, R., Graaf, S.P., Eriksson, B.M., Gillan, L., Morton, K.M., y O'Brien, J.K. (2004). Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim. Reprod. Sci* 82-83: 79-95.
- Palma, G.A. (2001) *Biotechnología de la Reproducción*. Argentina, El Paraíso, primera edición, 2001, pág. 318 - 385.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., First, N.L. (1984). Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biol. Reproduction* 32 (1): 112
- Pinkel, D., Lake, S., Gledhill, B.L., Van Dilla, M.A., Stephenson, D., y Watchmaker, G. (1982). High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry* 3: 1-9.
- Riera, P.I. (2005). *Avances de la técnica de preselección del sexo en el ganado porcino mediante separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo*. Universidad de Murcia.
- Schenk, J.L., Suh, T.K., Cran, D.G., y Seidel, G.E. Jr. (1999). Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52: 1375-1391.
- Schwiderski, H., B Lot Tner, S., Schwerin, M. (1991). Mikroinjektion um "in vitro" befruchtung mit spermien aus versuchen zur anreicherung der geschlechtsspezifischen spermientypen beim rind. *Reproduction in Domestic Animals* 26: 143-144

Unterberger F (1932). Sex determination and hydrogen ion concentration.  
Deutsche Medizinische Wochenschrift 58: 729-731

Wakin, P.E. (1972). Determining the sex of baby rabbits by ascertaining the pH of  
the vagina of the mother before mating. Osteopath Assoc. 72: 173.

Wolf, C.A., Brass, K.E., Rubin, M.I.B., Pozzobon, S.E., Mozzaquatro, F.D., De  
La Corte, F.D. (2008). The effect of sperm selection by Percoll or swim-up  
on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. Animal Reproduction,  
v.5, n.3/4: 110-115.

Zavos, P.M. (1985). Sperm separation attempts via the use of albumin gradients in  
rabbits. Theriogenology 23(6): 875-879.

### **Fuentes consultadas en Internet**

- <http://www.reprobiotec.com/> Junio, 2010
- <http://www.magapor.com/> Junio, 2010
- <http://www.grimaudfreres.com/> Febrero, 2011
- <http://www.hypharm.fr/> Febrero, 2011
- <http://www.extronasa.com> Febrero, 2011
- <http://www.infostat.com.ar/> Abril, 2011
- <http://www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/cunicultura/cunicultura.htm>  
Mayo, 2011
- <http://www.rabbit-guide.com> Mayo, 2011
- <http://www.childselect.com/> Mayo, 2011