

Capítulo LIX

Tecnologías reproductivas para la determinación del sexo en bovinos

Jessenia Mercado Carrillo, MV
Andrés A. Kowalski Sarralde, PhD

INTRODUCCIÓN

La aplicación de biotecnologías en la reproducción se ha convertido en una de las herramientas más importantes para acelerar los avances genéticos en la ganadería bovina. La diferenciación sexual de los mamíferos es un proceso secuencial que se inicia en el momento de la fecundación (XX o XY). La primera fase de diferenciación sexual ocurre con la organogénesis gonadal en función del sexo genético del embrión (Palma, 2001). El dimorfismo que existe entre los cromosomas sexuales es la base para determinación del sexo a través del cariotipo. En bovinos, el número diploide de los cromosomas es de 60, con un gran cromosoma X submetacéntrico y un pequeño Y metacéntrico y 58 restantes cromosomas acrocéntricos (Avery *et al.*, 1989, citado por Palma, 2001). El cromosoma Y determinará la formación de un individuo de sexo masculino y el espermatozoide X determinará la formación de un individuo de sexo femenino.

Varias metodologías se han aplicado para conocer el sexo, entre ellos la biopsia de blástomas de embriones para determinar o no la presencia del cromosoma Y. La técnica tiene una efectividad alrededor del 90%, siendo su principal ventaja la escasa probabilidad de dañar el embrión y su desventaja, que no siempre es fácil predecir el número de blastómeros necesarios para producir una cantidad suficiente de copias de ADN para determinar el sexo de los embriones (Shea, 1998). Esta biopsia del embrión se realiza aproximadamente cuando tiene 2 ó 3 días de desarrollo. En este periodo, los embriones pueden tener entre 8 y 16 células. La utilización de micromanipuladores permite remover una célula del embrión denominada blastómero, y se procede a la amplificación utilizando PCR de la región que se encuentra en el cromosoma Y (Kunieda y col., 1992).

Una serie de técnicas exitosas como la inseminación artificial y transferencia de embriones han sido difundidas en los programas de mejoramiento genético animal,

las cuales son implementadas como demanda de los sistemas de producción más eficientes, como las que han conducido al desarrollo de técnicas de selección del sexo. Esta biotecnología tiene un gran valor económico y muy significativo en la producción de leche y carne donde la productividad de los sistemas son favorecidos por la progenie de uno de los dos sexos (Palma, 2001).

SEMEN SEXADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Es un proceso de separación basado en la diferencia de la cantidad de ADN en el cromosoma X y Y (Grant y Chamley, 2007). La diferencia en el contenido de ADN entre los espermatozoides bovinos que llevan el cromosoma X es 3,8% más con respecto al cromosoma Y, en humanos es de aproximadamente el 2,8% y en la mayoría de los mamíferos están en el rango de 3-4,5% (Johnson, 2000). El cromosoma X es mayor que el Y debido a una mayor cantidad de cromatina heteróloga (Palma, 2001) (Figura 1).



Figura 1. Diferencia en tamaño de cromosoma X y Y en humanos.

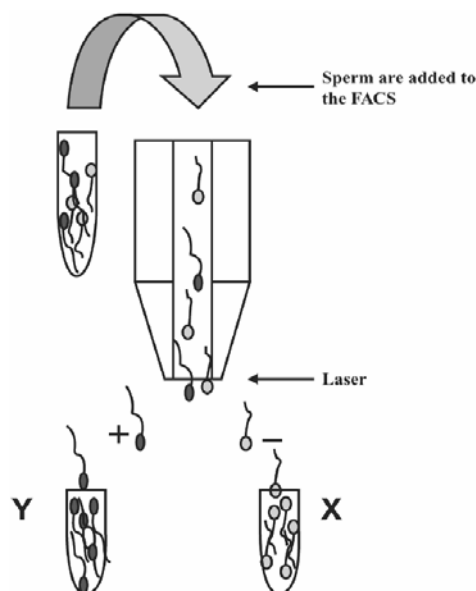


Figura 2. Proceso de separación espermática por citometría de flujo.

Una de las mayores limitaciones de la citometría de flujo es la tasa de clasificación, lo que significa que animales inseminados con semen sexado tienden a recibir menor concentración de semen por dosis que los animales que experimentan con inseminación artificial; el número de espermatozoides utilizado en la práctica normalmente es de 20×10^6 espermatozoides por dosis (Garner, 2001). Sin embargo, en un estudio donde se aplicaron dosis similares de semen sexado y no sexado para inseminación artificial

El proceso consiste en el paso de espermatozoides a través de un detector como el citómetro de flujo el cual mide la intensidad de fluorescencia resultado de la excitación de moléculas de colorante ligado al ADN; usualmente es generado por un láser y la fuerza de fluorescencia obviamente depende del número de moléculas fluorescentes unidas al ADN (Garner y Seidel Jr, 2002) (Figura 2). Aunque se han utilizado otros métodos como la exposición a luz UV, la misma causa daños para el ADN, estando afectada la motilidad de los espermatozoides bovinos sexados (Johnson *et al.*, 1997). Por esa razón, en este procedimiento de clasificación se ha empleado un nuevo colorante, Hoechst 33342, el cual colorea el ADN mas eficientemente y con menor daño en la morfología y motilidad del espermatozoide (Garner, 2001).

en vacas, la tasa de preñez resultó en 20-40% menos que los controles con semen no sexado (Seidel Jr. *et al.*, 1999). Sin embargo, uno de los principales problemas del uso del semen sexado es la lentitud del proceso en el cual se clasifican de 150 a 200 dosis de semen sexado por máquina por día; otro factor negativo de la técnica es la cantidad de espermatozoides dañados en el proceso que fluctúa alrededor del 70% de los espermatozoides que fallan al ser clasificados debido al daño o por la ausencia de distinción del espermatozoide al pasar por el citómetro (Weigel, 2004) (Cuadro 1).

Cuadro 1
Eficiencia Típica en el Sexado de Espermatozoides

Alícuota de Espermatozoides Coloreados	100%
Pérdida de espermatozoides coloreados en el tubo	10%
Pérdida al clasificar lotes entre tubos	12%
Espermatozoides que son Evaluados	78%
Espermatozoides descartados debido a mala orientación	30%
Espermatozoides descartados debido a coincidencias	15%
Espermatozoides descartados muertos	10%
Espermatozoides que son potencialmente clasificables	35%
Espermatozoides descartados al mantener la pureza porque la distribución de X y Y fluoresce con solapamiento de ambos	12+%
Espermatozoides descartados por probable aneuploidia	1%
Espermatozoides descartados debido a interrupción de gotas con espermatozoides X y Y	2%
Espermatozoides que han sido clasificados	30%
Espermatozoides perdidos en el final del fluido del tubo de colección	4%
Perdidas de Espermatozoides en el sobrenadante después de la centrifugación (paso de concentración)	15%
Pérdida de espermatozoides durante el llenado y sellado de pajuelas incluyendo volumen incompleto de residuo en la última pajuela	4%
Espermatozoides clasificados que son congelados	23%
Uso de espermatozoides para control de calidad (exactitud y motilidad después del descongelado) espermatozoides disponibles para inseminación (22%; 11% de cada sexo a un 90% de exactitud)	4%

Fuente: Seidel Jr *et al.*, 1999; Garner y Seidel Jr, 2002.

Otro problema es la baja tasa de concepción al utilizar espermatozoides sexados. En un estudio, novillas inseminadas con semen sexado presentaron una tasa de preñez del 35 vs. 55% para semen no sexado, sin embargo, la tecnología mostró ser efectiva para producir las crías del sexo deseado (Lu K *et al.*, 1999; Moore y Thatcher, 2006). Una de las estrategias para mejorar la eficiencia con el uso de semen sexado es la implementación del mismo semen en programas de producción de embriones *in vitro*; se busca incrementar la eficiencia del semen sexado con la idea que se requieren pocos espermatozoides para fecundar a un ovocito y que se pueden obtener crías genéticamente superiores y ser transferidas en receptoras de poco mérito genético; de igual manera, estos embriones también pueden ser congelados para su posterior uso o venta (Wilson *et al.*, 2005; Moore y Thatcher, 2006; Xu *et al.*, 2006) (Cuadros 2, 3 y 4).

Cuadro 2
Datos de maduración *in vitro*

T° de la solución salina	Raza de la vaca	N° de ovarios	Ovocitos colectados	Ovocitos/ ovario	% maduración
30 ± 1,1	Mest Cebu	193	2612	13,22 ± 5,4	54,4 ± 20,3

Fuente: Laboratorio de Embriología-UCLA, Venezuela, Dr. Andrés Kowalski.

Cuadro 3
Datos de producción de embriones *in vitro* usando semen sexado y no sexado

Grupo	Ovocitos/grupo	% fecundación	% blastocistos
Grupo No sexado	1401	62,1 ± 28,7	28,1 ± 17,8
Grupo sexado	648	18,8 ± 30,2	13,3 ± 13

Fuente: Laboratorio de Embriología-UCLA, Venezuela, Dr. Andrés Kowalski.

Cuadro 4
Características de las crías producidas con semen sexado y no sexado

Tratamiento	Duración Gestación (d)	Peso al Nacer (Kg)	Peso al Destete (Kg)	Tasa Aborto (%)	Tasa Muerte Neonatal (%)
Control	278,9/787	34,1/673	241,2/348	5,0/560	4,0/787
Sexado	279,0/1158	33,9/923	238,9/454	4,5/829	3,5/1158

Fuente: Tubman *et al.*, 2004.

Actualmente en Venezuela existe la más alta tecnología con personal altamente calificado para hacer posible estas estrategias de producción *in vitro* con valores significativos y adaptados a nuestras condiciones tropicales con el apoyo y asesoría de técnicos especializados. Como producto de ello nace la primera becerria por fecundación *in vitro* con el uso de semen sexado en Venezuela el 3 de julio de 2007 en la Agropecuaria Paraíso en el Estado Apure. La ternera recibió el nombre de Eva (Figura 3).



Figura 3. Eva, Primera Becerria Sexada producida *in vitro* en el Laboratorio de Embriología y Endocrinología Molecular (UCLA, Barquisimeto, Venezuela).

Esta tecnología permite que los productores puedan aprovechar ovarios de vacas que van a matadero, utilizando óvulos de vacas elites a través de la técnica de aspiración folicular intravaginal. Además maximiza el uso del semen utilizado, ya que con una dosis de semen de toros de alto mérito genético pueden fecundarse aproximadamente 200-300 ovocitos.

CARACTERÍSTICAS DE LAS CRÍAS PRODUCIDAS CON SEMEN SEXADO

El proceso de sexaje espermático podría dañar el ADN e incrementar la incidencia de anomalías genéticas, sin embargo más de 1000 nacimientos vivos producto de semen sexado han sido producidos sin anomalías observadas (Seidel Jr, 1999ab). Sin embargo, en un estudio realizado sobre la normalidad de las crías producidas, no se apreció diferencia significativa en las tasas de muerte neonatal y acumulada (Garner y Seidel Jr, 2002), lo cual es confirmado por otros estudios (Tumban L. *et al.*, 2004) que presentaron valores similares sin ninguna anomalía en los nacimientos que se produjeron (Cuadro 4).

Aplicación de Semen Sexado en Ganadería de Leche

Al utilizar semen sexado enriquecido con el cromosoma X de toros genéticamente superiores para inseminar vacas lecheras elite y producir las hembras de reemplazo, las fincas incrementarían la presión de selección para características de producción de leche (Hohenboken, 1999). Entre algunas de las aplicaciones que se le pueden dar al semen sexado para incrementar su eficiencia y disminuir costos están las siguientes:

- Inseminar vacas de elevado mérito genético con semen sexado enriquecido con el cromosoma X para producir el número necesario de reemplazos.
- El remanente de vacas no seleccionadas inseminarlas con semen convencional no sexado de carne para producir crías que serían más valoradas por su producción de carne que de leche.

Aplicación de Semen Sexado en Ganadería de Carne

En el sistema de ganadería de carne varios de los factores beneficiosos a considerar son la edad de puberal y a la madurez sexual, fertilidad, conducta materna, adaptación a cambios ambientales. Para el apareamiento de las vacas madres se implementaría el uso de semen enriquecido con cromosoma Y de toros genéticamente superiores, lo cual añadiría el beneficio económico y más elevadas proporciones de nacimientos machos para la venta. El remanente de hembras no seleccionadas para producir reemplazos podría ser apareado con semen sexado enriquecido con cromosoma X de toros de elevado mérito genético para características importantes a nivel de matadero tales como tasa de crecimiento, eficiencia de alimentación, masa muscular, marmoleo y calidad en canal (Hohenboken, 1999).

CONCLUSIÓN

El uso de semen sexado para la determinación del sexo de las crías es efectivo y representa una gran alternativa para aplicarlo comercialmente en las ganaderías DP de la zona tropical, considerando apenas la mitad de la población de hembras para producir el rebaño de reemplazo, lo que aunado a la utilización de la inseminación artificial y la transferencia de embriones permitiría maximizar el progreso genético esperado de año a año. La producción de embriones *in vitro*, igualmente ofrece a Venezuela la posibilidad de levantar con mayor eficiencia a las crías de reemplazo con el uso de semen sexado, adaptado al ambiente y a las condiciones tropicales y bajo un buen sistema de manejo en las fincas. Actualmente en Venezuela existen una serie de Laboratorios que inician sus trabajos en el campo de la biotecnología. El Laboratorio de Embriología y Endocrinología Molecular de La Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado desarrolla líneas de investigación con la finalidad de establecer nuevas estrategias para determinación del sexo de embriones bovinos producidos *in vitro* modificando la proporción de los sexos, utilizando cambios sobre las condiciones de cultivo *in vitro* y determinando el sexo a través de técnicas de Biología Molecular. De esa manera se podrán reducir costos por embrión producido y generar mayores beneficios tanto para la producción de leche como la de carne, ya que esto crearía la posibilidad de inclinar la proporción de los sexos dependiendo del tipo de producción hacia la cual los productores deciden orientar sus rebaños.

LITERATURA CITADA

- Garner D. 2001. Sex-Sorting Mammalian Sperm: Concept to Application in Animals. *J Andrology*. 22 (4).
- Garner D, Seidel Jr. 2002. Current Status of Sexing Mammalian Spermatozoa, *Reproduction* 124, 733-743.
- Grant V, Chamley L. 2007. Sex-Sorted Sperm and Fertility: An Alternative View. *Biol Reprod* 76, 184-188.
- Hohenboken W. 1999. Applications of Sexed Semen in Cattle Production. *Theriogenology* 52, 1421-1433.
- Johnson L. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art *Anim Reprod Sci* 60-61: 93-107.
- Kowalski AA. 2005. Determinación y Preselección del Sexo en Ganadería Bovina. En, *Manual de Ganadería Doble Propósito*. C Gonzalez-Stagnaro, E Soto-Belloso (Eds). Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo-Venezuela VIII (6) 626-630.
- Lu K, Gran D, Seidel Jr. 1999. In Vitro Fertilization with Flow-Citometrically-Sorted Bovine Sperm. *Theriogenology* 52, 1393-1405.
- Moore K, Thatcher W. 2006. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 89:1254-1266.
- Palma G. 2001. *Biotecnología de la Reproducción, selección del Sexo en Mamíferos*. Argentina 1^{era} Edición
- Seidel Jr. 1999a. Sexing mammalian spermatozoa and embryos—state of the art. *J Reprod Fertil* (suppl 54):475-485.

- Seidel Jr. 1999b. Commercializing reproductive biotechnology—the approach used by XY, Inc. *Theriogenology* 51: 5.
- Seidel Jr, Schenk J, Herickhoff L, Doyle S, Brink Z, Green R, Cran D. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52:1407-1421.
- Shea B. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology* 51:841-854.
- Tubman L, Brink Z, Suh T, Seidel Jr. 2004 Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J Anim Sc.* 82:1029-1036.
- Weigel K. 2004. Exploring the Role of Sexed Semen in Dairy Production Systems *J. Dairy Sci.* 87:(E. Suppl.):E120-E130.
- Wilson R, Weigel K, Fricke P, Rutledge J, Leibfried-Rutledge M, Matthews D, Schutzkus V. 2005. In Vitro Production of Holstein Embryos Using Sex-Sorted Sperm and Oocytes from Selected Cull Cows. *J. Dairy Sci* 88:776-782.
- Xu Guo Z, Su L, Nedambale T, Zhang J, Schenk J, Moreno J, Dinnye´s A, Ji W, Tian X, Yang X, Du F. 2006. Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm. *J Dairy Sci* 89:2510-2518.