



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

BIOTECNOLOGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN DE TERCERA GENERACIÓN EN BOVINOS: SEXAGE DE SEMEN Y DE EMBRIONES

Dr. Decuadro-Hansen

IMV Technologies
Centre d'Insémination Artificielle de L'Aigle
L'Aigle, France

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías de la reproducción animal comprenden clásicamente tres generaciones: la primera, la más antigua, es la inseminación artificial; la segunda comenzó a desarrollarse en la década de los 70 es el trasplante de embriones; la tercera se encuentra en vías de desarrollo y está constituida por el sexaje de semen y de embriones, la fecundación in vitro y la clonación (Thibier M. and Guerin B. Les biotechnologies de la reproduction et amélioration sanitaire du troupeau. Recueil de Med. Vet. Numéro special Réproduction des ruminants, 249-258). El punto en común de estas biotecnologías es el de contribuir a la mejora sanitaria de los rebaños. De esta manera, estas técnicas, han permitido y permiten disminuir el riesgo sanitario gracias a la supresión del contacto directo entre los reproductores machos y hembras.

La predeterminación selectiva del sexo en los animales domésticos y en el hombre ha sido un objetivo mayor en producción animal. Numerosos métodos han sido invocados, especialmente en humanos, generalmente basados en la mitología o superstición, yendo desde el consumo de una dieta particular basándose en carnes rojas para obtener un niño varón hasta el consumo de vino tinto y sangre de leones durante la luna llena (Jafar S.I and Flint APF: Sex selection in mammals: a review, Theriogenology 192-200).

Recientemente fue posible distinguir y predeterminar el sexo de los animales domésticos gracias al reconocimiento de las diferencias existentes entre los cromosomas X e Y en espermatozoides (spz) y células embrionarias.

Al presente, el técnico veterinario posee diferentes metodologías destinadas a predeterminar el sexo de los terneros: a) el diagnóstico por ultrasonografía rectal del sexo fetal realizado entre 55-70 días de gestación; b) el sexado *in-vitro* de embriones de 6 a 8 días y por último c) el sexado de los espermatozoides destinado a la inseminación artificial.

Aplicaciones del sexado

a) Sexado de embriones:

La posibilidad de transferir embriones del sexo deseado permite *disminuir sensiblemente el número de receptoras* que deben prepararse lo que es siempre una preocupación mayor del técnico y del cabañero. De esta forma esta biotecnología contribuye a mejorar la rentabilizar la técnica del trasplante de embriones gracias a la disminución de los costos de preparación, manejo y alimentación de las vaquillonas receptoras. Esta biotecnología adquiere mayor interés para cabañeros que desean planificar su reposición dentro de un esquema de selección genética global tal como los usados habitualmente en Europa los cuales inclu-

yen un porcentaje importante de donantes vaquillonas (por ende sin conocer sus performances lecheras) en sus programas de selección.

Para esos cabañeros, el trasplante de embriones "hembra" colectados de vacas adultas de performances conocidas permite *acelerar el progreso genético* global del tambo gracias el aumento del número de vaquillonas de reposición producidas a partir de vacas de alta calidad genética (Colleau, J. Intérêt possible des biotechnologies de l'embryon pour la sélection des bovins laitiers, INRA Prod. Anim. 1992 hors serie 243-247).

b) Sexado de semen:

Es una regla general, según el esquema de producción, en bovinos (leche o carne) que uno de los dos sexos sea un subproducto. Poder elegir el sexo de los bovinos contribuiría a incrementar la rentabilidad de los rodeos de producción de leche o carne.

Así los productores de leche podrían utilizar el semen sexado X para producir *las vaquillonas de reposición* inseminando un porcentaje de las mejores vacas y el resto con semen sexado Y de una raza carnífera a los efectos de dar un valor agregado a los terneros de descarte.

Los productores de carne pueden, gracias al uso del semen sexado "hembra", *disminuir los problemas de distocia* en vaquillonas reduciendo así el intervalo entre partos así como las consecuencias nefastas que este problema acarrea cuando esta presenta en sistemas extensivos a campo: el aumento de la mortalidad de vacas y terneros, aumento de los problemas de retención de placenta, disminución de la producción de leche, aumento de los costos de asistencia veterinaria, etc. Los productores podrían así acceder, por ejemplo, a servicios precoces a los 15-17 meses en buen estado corporal sin correr el riesgo de tener un porcentaje alto de distocia de vaquillonas que paren terneros machos.

La eficacia de los programas o *test de progenie* puede verse mejorada en forma significativa gracias al sexaje de semen. En esquemas de selección lecheros las inseminaciones de "testaje" sobre vacas producen promedialmente el 50% de terneros machos los cuales no se evalúan dentro del programa. El uso de semen sexado "hembra" permitiría optimizar dichos esquemas de selección: solo 50% de las inseminaciones hoy realizadas serían necesarias para obtener la descendencia que permite evaluar un toro en un centro de inseminación (CIA), lo cual redundaría en la reducción de los costos del test de progenie en forma significativa. La evaluación genética de un toro en una cooperativa de inseminación artificial se realiza en tres diferentes niveles: a) la selección por ascendencia o pedigree, b) la selección individual y c) la selección por descendencia o test de progenie. Los toros jóvenes o toros de "testaje" requieren, según los diferentes esquemas de selección y según las razas, 80 hijas que completen una lactación en 60 tambos diferentes a los efectos de alcanzar un coeficiente de determinación de 0.70, condición "sine qua non" para aceptar o no un toro en un CIA. En 1975 se necesitaban 6 inseminaciones con semen no sexado a los efectos de producir una vaquillona que termine su primera lactancia (Everett, R.W. 1975 Income over investment in semen. J. Dairy Sci. 58:1717). Hoy en día, el número de inseminaciones necesarias para la obtención de una



hembra que termine su primera lactancia puede ser mayor aún, sobre todo debido a los problemas de fertilidad constatados especialmente en raza Holando, así como al incremento del número de inseminación es realizadas por técnicos no capacitados. El uso del semen sexado permitiría reducir en 50 % el número de inseminación es requeridas para producir una vaquillona que finalice una lactancia.

Las cooperativas de selección genética y los cabañeros podrían tener acceso a una producción incrementada de toros a partir de animales de alto merito genético.

La utilización del semen sexado para inseminar vacas donantes de elite o en un programa de fertilización *in-vitro* (FIV) permitiría producir el doble de embriones de un mismo sexo por lavado o FIV reduciendo el costo de producción del embrión y del ternero nacido.

Por lo tanto, esta biotecnología aumentaría la eficacia de los bancos de semen y embriones de especies en riesgos de extinción (Schenk J.L., Applying sperm sexing technology to the AI industry Proceed. Of the 18th tech. Conf. On Anim. Insem. § Reprod. 2000 73-78).

LOS PRINCIPIOS TÉCNICOS DEL SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES Y EMBRIONES

a) Sexado de semen

Los spz de los mamíferos pueden ser separados en función de tres técnicas diferentes basadas en diferencias entre los gametos portadores de cromosomas X e Y, a saber: el contenido en ADN de cada uno, el tamaño de los spz y las proteínas existentes en la membrana del spz.

a.1 El contenido en ADN

Durante la meiosis el numero de spz pasa de $2n$ a n . Los spz poseen un solo cromosoma sexual ya sea el Y o el X. El cromosoma X tiene un tamaño superior a del cromosoma Y, del orden del 2.8 al 7.1 % según la especie animal, y a mayor tamaño mayor su contenido en ADN.

Los spz X producidos por el toro y responsables de la producción de terneras contienen en promedio 3.8% mas de ADN que los spz Y. Una pequeña variación existe entre los bóvidos según la especie y la raza: *bos-taurus*: 3.98 (Holstein), 4.05 (Angus), 4.24 (Jersey), *bos-indicus* 3.78% (cromosoma Y "acrocéntrico", Garner D. comunicación personal).

Es posible cuantificar el contenido de ADN gracias a la utilización de un colorante "marcador" fluorescente: el Hoeschst 33342. El mismo cuando entra en contacto con el spz se liga al ADN, y al ser excitado por una luz ultravioleta (UV) emite una fluorescencia azul. La intensidad de la fluorescencia emitida por un spz marcado con el Hoeschst y excitado con UV es directamente proporcional a su contenido en ADN. La cantidad de fluorescencia emitida por un spz X será por lo tanto 3.8% superior a aquella emitida por un spz Y. La citometría de flujo permite analizar individualmente varios miles de células por segundo (Figura 1). De esta forma la cantidad de fluorescencia emitida por cada spz que atraviese el rayo láser es medida y permite separar los spz en X e Y (Figura 2). Sin embargo, debido a la forma plana de los spz, su orientación durante el pasaje a través del rayo láser condiciona la calidad de la medida de la intensidad de la fluorescencia. Solo aquellos spz correc-

tamente orientados podrán ser correctamente sexados. Por esta razón se diseñó una aguja modificada destinada a dosificar los spz en el flujo permitiendo separar el 70% de los spz, contra el 25% obtenidos con la aguja convencional (Johnson LA y Pinkel D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 7:268

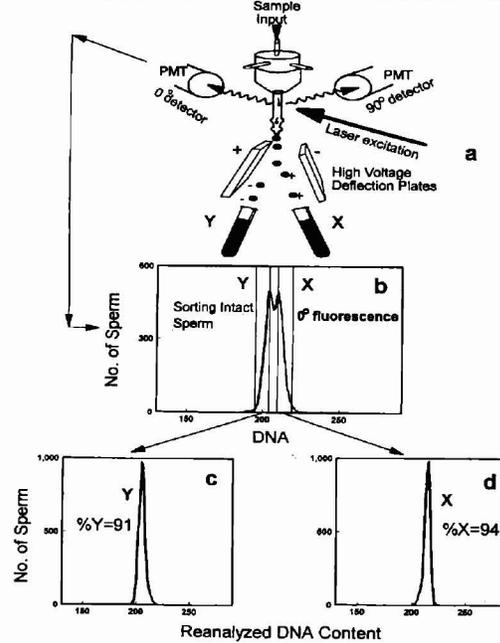


Figura 1 Representación esquemática de un citómetro de flujo para separar spz modificado por Johnson y cols. (Johnson LA, 2000 Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 93-107).

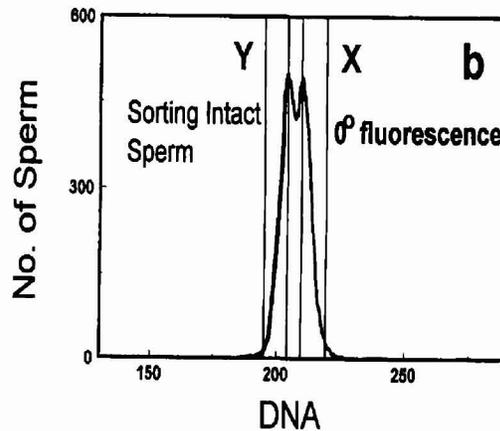


Figura 2 Histograma obtenido después del análisis por citometría de flujo del contenido de ADN de los spz (Johnson LA y Welch, 1999 Sex preselection: high speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum

X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

efficiency. *Theriogenology*; 52:1323-1341). En este sentido cuando el semen diluido y teñido pasa por el citómetro, es excitado por el láser, emitiendo una luz intensa. A posteriori, una aguja vibratoria pulveriza los spz en forma de microgotas las cuales se cargan eléctricamente (positivamente las que portan X y negativamente las portadoras de los Y); sin embargo no reciben carga las microgotas con un spz X y uno Y, ni las microgotas sin spz, o con spz muertos o no sexables). Un campo electroestático desviará la microgota en función de su carga en el tubo de colección X o Y Figura 3.

Esta técnica demostró ser eficaz para la separación de la mayoría de los spz de los mamíferos domésticos incluido el hombre. La eficacia de dicho procedimiento se ha incrementado en estos últimos años: se forman entre 90 – 110.000 microgotas por segundo y se alejan del pulverizador a una velocidad de 100 Km/h. Se pueden hoy en día recoger con un 90% de exactitud 4-5000 spz vivos de cada sexo / segundo dependiendo de las características del eyaculado. Con una pureza del 90%, hoy pueden obtenerse entre 15-20 millones de spz de cada sexo por hora (Johnson LA y Welch, 1999 Sex preselection: high speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*; 52:1323-1341). La limitante prin-

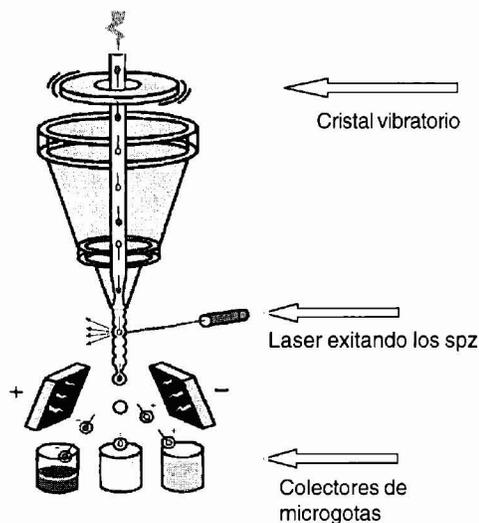


Figura 3: Separación de spz por el principio de citometría tipo Moflo.

cipal continua siendo la velocidad de sexado, la cual es inversamente proporcional a la pureza. Hoy en día, de 100 spz que pasan en el citómetro solo se sexa el 20% debido al factor orientación del spz al atravesar el rayo láser así como debido a el hecho que solo son tomados para la IA las poblaciones aisladas de spz X e Y (cumbres de los histogramas, ver Figura 2).

Se han realizado inseminaciones con dosis de 1.5-3 millones de spz sexados y congelados. Los resultados obtenidos indican una fertilidad inferior con el semen sexado que con el no sexado (tabla 1).

Este método de sexado es hoy en día comercializado por la empresa XY Inc que adquirió la patente depositada por la USDA. La separación se efectúa por un citómetro de flujo de alta velocidad tipo Moflo comercializado por Cytomation (USA).

Esta firma pretende otorgar licencias de explotación a los CIA, siendo el valor actual de los citómetros del orden de US\$ 280.000.

La utilización conjunta de un colorante tipo Hoestch y de rayos UV puede potencialmente ser considerados como mutagénicos y por ende ocasionar problemas sanitarios en la medida que los animales así producidos ingresen en la cadena alimenticia del hombre. No obstante, ningún reporte presentó hasta ahora anomalías o signos clínicos en terneros nacidos por esta biotecnología. Por último y teniendo en cuenta la concentración de spz sexados utilizados / pajueta, esta técnica se recomienda por ahora exclusivamente en vaquillonas.

a.2 El tamaño de los spz

El tamaño de los spz es un criterio interesante de selección de spz en función de su sexo ya que no necesita de ninguna coloración. Así, fue propuesta la medida del volumen de la cabeza del spz bovino separado por una técnica de microscopía cuantitativa seguida de un análisis de imágenes computarizado. La diferencia de volumen medido es del orden de 3.8% valor idéntico a la diferencia observada en material de ADN. Esto pone en evidencia que existe una diferencia de tamaño "medible" entre las cabezas de los spz X e Y, y que la misma es debida a el contenido en ADN (Van Munster EB, Stap J, Hoebe RA, Temeerman GJ, Aten JA, 1999 Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X and Y spermatozoa: potentiels and limitations. *Theriogenology*; 52: 1281-1293).

Sin embargo las medidas realizadas por el equipo de Van Munster se limitaron a cabezas aisladas de spz y no a spz enteros. Es posible que la variación en el tamaño del flagelo pueda esconder diferencias de tamaño entre las cabezas de los spz. Estas diferencias de

Tabla 1: Fertilidad obtenida por Seidel y col. Después de inseminar vaquillonas con semen sexado y congelado (Seidel GE, Schenk JL, Herichkoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, Cran DG, 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*; 52: 1407-1420).

Tipo de semen	Numero de spz inseminados	Numero de vaquillonas	de Vaquillonas preñadas
Sexado	1-1.5x 10 ⁶	176	98(56%)
Sexado	3 x 10 ⁶	171	88(51%)
Control	20 x 10 ⁶	183	124(68%)



tamaño de los spz son responsables del desarrollo de otras técnicas de selección de spz tales: la filtración, la sedimentación y la centrifugación. Hoy en día, ninguna de estas técnicas ha permitido obtener resultados satisfactorios y repetibles en condiciones de campo.

a.3 Las proteínas de la superficie de la membrana

Los cromosomas son el soporte de información genética de las células. Teniendo en cuenta que los cromosomas sexuales son diferentes podemos pensar que el contenido genético es también diferente. La expresión del material genético de una célula desencadena, entre otras cosas, la producción de proteínas. Podemos por lo tanto suponer que las diferencias de material genético existente entre los spz X e Y inducen diferencias en el contenido proteico de cada uno de estos spz.

Los trabajos de Blecher en la Universidad de Guelph (Canada) proponen una técnica nueva destinada a la determinación del sexo en los spz. Así dicho investigador a podido identificar varias proteínas específicas del sexo macho o hembra y ha podido obtener anticuerpos capaces de aglutinar los spz hembra. Dichos spz hembra "aglutinados" le permitieron la producción *in-vitro* de embriones de sexo macho (Blecher SR, Howie R, Detmar J, Blahut LM. 1999 A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology*; 52: 1309-1321). Estos trabajos preliminares parecen indicar la posibilidad de producir anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la membrana de los spz específicas de cada sexo. La empresa Gensel (Canada) retomo los trabajos de Blecher a los efectos de elaborar una técnica de sexaje por aglutinación inmunológica. No obstante, al día de hoy, este método no se ha lanzado a el mercado.

b. El sexado de embriones

El trasplante de embriones en bovinos contribuye ampliamente a la difusión del progreso genético en los redeos comerciales. La posibilidad de sexar dichos embriones antes de transplantarlos (siempre y cuando se disponga de una técnica simple, fiable, económicamente accesible y que permita un porcentaje de preñez aceptable) permitiría optimizar el programa de selección genética de un centro de inseminación artificial.

La determinación del sexo del embrión es posible en embriones colectados de vacas donantes entre el día 6 y 8 (Día 0= día del celo). En ese estado el embrión bovino mide aproximadamente 100 micrones de diámetro y contiene entre 120 a 200 células. El fundamento de esta biotecnología es la puesta en evidencia del cromosoma Y, específico del macho.

Las técnicas propuestas para sexar los embriones bovinos son:

b.1: El estudio del cariotipo

Las primeras tentativas de sexaje de embriones de mamíferos antes de ser transplantados remontan a la década de los años 80. En dicha época los investigadores basaban la determinación del sexo gracias al análisis de los cromosomas (Picard L, King WA, Betteridge KF. 1987 : Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet. Rec.* 1987, 114, 240-243). Los ensayos de sexaje realizados a partir de biopsias de 10-20 células o de la mitad de un embrión (Leibo SP and Winninger: Production of bovine pregnancies from embryos transported at 0°C by air. *Theriogenology*, 1986,

25,165-abstr-) permitan el diagnóstico del sexo del embrión que en 30 a 60 % de los casos respectivamente. No obstante el interés de esta técnica radica en su exactitud que es del 100 %.

b.2 Antígenos H-Y

Otro método consiste en la detección inmunológica de del antígeno H-Y considerado específico de los machos (Watchel SS, Nakamura D, Watchel G, Felton W, Kent M, and Jaswaney V- Sex selection with monoclonal H-Y antibody. *Fert. Steril.* 1988, 50, 355-360). Lamentablemente esta técnica no ha sido suficiente exitosa como para aplicarla en condiciones de campo.

b.3: Sonda molecular específica del cromosoma Y bovino

Actualmente esta técnica es y continua siendo la más precisa y sencilla. La misma viene empleándose en Francia en condiciones de campo desde 1990 (Nibart M et Thibier M: 1992 Transfert embryonnaire chez les bovins avec référence particulière à l'interaction embryon-agents pathogènes.- *Ann. Zootech.*, 41: 341-346).

El fundamento de esta técnica de sexado consiste en detectar por biología molecular y a partir de células embrionarias colectadas por biopsia la presencia de una secuencia específica de ADN del cromosoma Y la cual es característica del embrión "macho", mientras que su ausencia indica un embrión "hembra".

Después de el descubrimiento de las posibilidades de amplificación enzimática del ADN de las células (Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Elrich HA, Arnheim- Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science*, 1985 230, 1350-1354), los investigadores del instituto INRA (Institut de recherche agronomique, France) desarrollaron una técnica de sexaje por amplificación enzimática de una secuencia específica: técnica del PCR (PCR= Polymerase Chain Reaction) . Esta tecnología fue explotada por el laboratorio Rhône-Mérieux (Khone G, Baudu P, Nibart M, Esposito L, Desmetre P, et Thibier M: Sexage rapide des embryons bovins par amplification d'ADN. In: 6ème colloque de la AETE, Lyon 1987, P. 162), así como por Australianos (Herr CM, Holst NA, Matthaer KI, Reed KC: Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid y-chromosome detection assay. *Theriogenology* 1990, 33, 247) y Americanos (Bondioli KR, Ellis SB, Pryor JH, Williams MW, Harpold MM: The use of male specific chromosomal dna fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 1989, 31, 95-103).

El sexado es realizado por biopsia de 5-10 células del embrión de buena calidad a partir de las cuales la determinación del sexo reposa en la detección de una secuencia específica de ADN del cromosoma Y bovino por el intermedio de una sonda molecular complementaria (actualmente 5 sondas específicas del cromosoma Y son conocidas, siendo la del INRA la primera hallada). Esta secuencia es amplificada por PCR. El ADN así amplificado es separado por electroforesis y visualizado por fluorescencia.

Las principales ventajas de esta biotecnología son su *especificidad* (solo el fragmento deseado de ADN Serra



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

amplificado) estimada a 100% (Nibart M. 1991 Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage, Rec. De Méd. Vet. Spécial Reprod. des ruminants 261-289) y la gran *sensibilidad* (es posible obtener una cantidad importante de ADN a partir de una simple célula). No obstante debido a esta alta sensibilidad es necesario tomar precauciones máximas durante la operación de manipulación de la biopsia para no contaminar la muestra y amplificar un fragmento de ADN no deseado. Así, 2 células de un "macho" que contamine una biopsia de un embrión "hembra" puede ser responsables de una interpretación errónea de la biopsia.

La reacción que se desarrolla en tres etapas diferentes que son: a) desnaturalización, o sea la separación de las cadenas de ADN que serán amplificadas, b) la hibridización de los nucleótidos del ADN a ser amplificado y c) la polimerización o encadenamiento en la cual se sintetiza el ADN por intermedio de una enzima polimerasa a alta temperatura.

El porcentaje de respuesta obtenida es del 95%, o sea que solo el 5% de los casos el sexo no pudo ser determinado.

El material necesario para llevar a cabo un sexaje en condiciones de campo es: un micromanipulador acoplado a una lupa invertida (biopsia), el termociclador (en donde se lleva a cabo la reacción de amplificación), un kit sexaje, lupas, pipetas, vortex, cuva de electroforesis, agarosa, una microcentrífuga, aceite mineral, un freezer, un horno de microondas, una lupa, PBS con BSA, cajas de petri, conos de osmometría, tips y micropipetas.

Tecnicidad del equipo y Porcentaje de preñez:

Los porcentaje de preñez obtenidos por el autor con embriones biopsiados frescos varían de 48 al 65% (ver tabla 2) y están de acuerdo a lo hallado por otros autores (Nibart M. 1991 Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage, Rec. De Méd. Vet. Spécial Reprod. des ruminants 261-289). Desde el inicio de la utilización de esta biotecnología en condiciones de campo en Francia se han incrementado los porcentajes de éxito en forma importante, a un ritmo de 4% anual, lo cual denota la importancia del trabajo en equipo.

Debe señalarse que los mejores resultados obtenidos por el autor y presentados en las tablas 2 y 3 fueron logrados en receptoras vaquillonas y con embriones calidad 1 así como con un intervalo colecta-biopsia-congelación inferior a 4 horas.

	Numero total de embriones biopsados y sexados	Porcentaje de preñez
1998	145	51%
1999	130	48,46%
2000	88	64,67%
2001	86	65,11%

Tabla 2. Decuadro-Hansen, Pezavent P y Gaillard Porcentajes de preñez obtenidos por trasplante de embriones biopsiados frescos entre 1998 y 2001 por el equipo TE del Centre d'Insémination artificielle de L'Aigle, France.

Numero total de embriones biopsados y sexados	Porcentaje de preñez
82	51%

Decuadro-Hansen, Pezavent P y Gaillard

Tabla 3: Porcentajes de preñez obtenidos por trasplante de embriones biopsiados y congelados en etilenglicol 1.5 mM en 1999 y 2001 por el equipo TE del Centre d'Insémination artificielle de L'Aigle, France.

Una comunicación reciente de un equipo canadiense señala excelentes porcentajes de preñez de embriones biopsiados y congelados en dos etapas: primera etapa baño en una solución de Agarosa al 1% y una segunda etapa en una base de etilenglicol 1.5 mM (Dupras R and Laurence S The use of Agarose in the freezing of sexed bovine embryos. Theriogenology January 1 Vol 53, N° 1 IETS, Maastricht, 2000 p. 254).

CONCLUSIÓN:

Durante los últimos años se han hecho progresos sustanciales en investigación en materia de sexaje de spz y embriones en bovinos. Las instituciones de selección genética en bovinos así como los cabañeros deberían valorar las potencialidades ofrecidas por las Biotecnologías de la reproducción a través de la ayuda que las mismas engendran en materia de progreso genético. Sin embargo los criterios de rentabilidad son cruciales para la implantación definitiva de estas técnicas y estudios genético-económicos deberían ser realizados a corto plazo.

Lograr resultados reproductivos aceptables con estas Biotecnologías requiere de un manejo correcto del rodeo así como de técnicos entrenados. Esto es particularmente cierto en el caso del semen sexado el cual será comercializado en "bajas concentraciones / dosis.