

Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro**

Oses, M.V.; Teruel, M.T.; Cabodevila, J.A.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA).
Campus Universitario (B7000GHG), Tandil. Tel. 02293-439850. E-mail: jcabo@vet.unicen.edu.ar.

Resumen

Oses, M.V.; Teruel, M.T.; Cabodevila, J.A.: Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *Rev. vet.* 20: 2, 138-145, 2009. El control del sexo de la descendencia ha sido siempre uno de los objetivos más buscados en la actividad pecuaria. Desde 1992 se utiliza la citometría de flujo, técnica que permite diferenciar los espermatozoides X e Y según su contenido de ADN. El grado de certeza del sexo es aproximadamente 90% y la frecuencia de terneros nacidos normales es similar a la obtenida con semen convencional. El objetivo de esta revisión es analizar los resultados de la aplicación del semen sexado mediante la mencionada técnica en inseminación artificial (IA), transferencia embrionaria (TE) y fertilización *in vitro* (FIV). En IA se ha trabajado con semen sexado principalmente a celo detectado, obteniéndose porcentajes de preñez entre 5 y 35% inferiores a los logrados con semen convencional; la utilización del semen sexado en inseminaciones a tiempo fijo (IATF), es reciente, con resultados preliminares alentadores; no obstante no se ha comparado semen sexado y convencional. En TE, el semen sexado se ha utilizado en inseminaciones a celo detectado y en IATF con resultados generalmente inferiores a los logrados con semen convencional. Las variaciones en el número de inseminaciones y dosis utilizadas impiden definir aún un protocolo de trabajo recomendable. En FIV, el semen sexado ha sido utilizado para fecundar ovocitos provenientes de ovarios de matadero y de animales vivos; el porcentaje de blastocistos obtenido resultó generalmente inferior al logrado con semen convencional, destacándose la variabilidad observada en el semen sexado (0 a 25,8%), respecto al convencional (26,3 a 33,6%). En conclusión, es factible utilizar el semen sexado en IA, TE y FIV; no obstante, los resultados generalmente son inferiores a los que se obtienen con semen convencional y son afectados por numerosos factores. Su conocimiento y control, sumados a avances en la metodología de sexado permitirán mejorar los resultados actuales de la aplicación de la técnica.

Palabras clave: semen sexado, inseminación artificial, transferencia embrionaria, fertilización *in vitro*.

Abstract

Oses, M.V.; Teruel, M.T.; Cabodevila, J.A. Utilization of sexed semen in artificial insemination, embryo transfer and *in vitro* embryo production in cattle. *Rev. vet.* 20: 2, 138-145, 2009. Control of offspring's sex has always been one of the principal objectives in animal production. Since 1992, flow cytometry is used to differentiate between X and Y spermatozooids according to DNA content. Sex determination can be achieved with an accuracy rate higher than 90% and the frequency of calves delivered alive is similar to that observed for conventional semen. The objective of the present work was to analyze the results obtained in artificial insemination (AI), embryo transfer (ET) and *in vitro* fertilization (IVF) programs when using sexed semen. In AI sexed semen was used mainly with heat detection and the pregnancy rates were between 5-35% lower than those obtained with conventional semen. As to fixed-time artificial insemination (FTAI), use of sexed semen is quite recent and preliminary results are promising; however, comparison to conventional semen results has not been done yet. In ET, sexed semen was used in inseminations with heat observation and FTAI, obtaining results lower than those with conventional semen. Determining of an optimal protocol has not been possible, since reported works used different numbers of

* Extractado de la tesina presentada por la primer autora para acceder al grado de Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA).

inseminations and sexed semen doses. In IVF, sexed semen was used to fertilizing oocytes collected from both slaughter houses and live animals. Percentage of blastocytes was lower than that obtained with unsexed semen, also a higher variability was observed with sexed semen (0–25.8%) compared to unsexed semen (26.3–33.6%). In conclusion, successful utilization of sexed semen in AI, ET and IVF programs is feasible; however, results are generally lower than those achieved when using conventional semen and also influenced by different factors. Further knowledge and control of variables, along with improvement of semen sexing technologies, will determine better and more predictable results.

Key words: sexed semen, artificial insemination, embryo transfer, *in vitro* embryo production.

INTRODUCCIÓN

El origen de la determinación sexual de la descendencia de los mamíferos siempre fue motivo de especulaciones. Debido a ello, durante miles de años dio origen a diversas creencias, suposiciones y teorías⁵.

A partir de la década de 1980 comenzó a aplicarse una técnica denominada citometría, que permite separar los espermatozoides de acuerdo a sus cromosomas sexuales. Dicha técnica se basa en diferenciar los espermatozoides X e Y, en base a su contenido de ADN. En la mayoría de los mamíferos, el cromosoma X es mayor y posee más ADN que el Y. En 1989 se obtuvo el nacimiento de gazapos vivos luego de la inseminación intratubárica de conejas¹⁰. Desde entonces, se han obtenido descendientes de sexo preseleccionado con una exactitud cercana al 90% en bovinos, ovinos, cerdos y equinos¹⁸.

En producción bovina, la inseminación artificial (IA) con espermatozoides seleccionados acelera el mejoramiento mediante un aumento del progreso genético anual. Además, en determinados sistemas como aquellos dedicados a la producción de leche, es de fundamental importancia para lograr una mayor rentabilidad. Con la generación de hembras, se garantiza la reposición de futuras vacas lecheras en el rodeo.

El control del sexo de la descendencia tiene una importancia aún mayor cuando se aplican técnicas de reproducción asistida tales como la transferencia embrionaria (TE) y la fertilización *in vitro* (FIV).

Acorde a lo antedicho, el objetivo de esta revisión bibliográfica es aportar información sobre los resultados de la aplicación del semen sexado mediante citometría de flujo en programas de IA, TE y FIV.

LA CITOMETRÍA DE FLUJO COMO TÉCNICA DE SEXADO DE SEMEN

En el caso de los bovinos, los espermatozoides X que producen terneras contienen en promedio 3,8% más ADN que los espermatozoides Y que producen machos. La calidad y concentración espermática de los eyaculados son quizás los factores más importantes para obtener una buena separación de las dos poblaciones espermáticas. Así lo demuestran resultados que

indican una alta correlación entre la motilidad espermática, la concentración y la separación de las poblaciones en un citómetro de flujo de alta velocidad. Por ende, la separación de espermatozoides X e Y se lleva a cabo normalmente en eyaculados con más del 50% de espermatozoides con motilidad progresiva y 75% de espermatozoides normales^{14,21}.

El semen se incuba con un colorante que tiñe el ADN de los espermatozoides (Hoechst 33342), el cual tiene la particularidad de emitir una fluorescencia cuando es sometido a la luz láser. A mayor cantidad de ADN (espermatozoides con cromosoma X), mayor fluorescencia. Para poder detectar la diferencia de fluorescencia y separar los espermatozoides deseados, se utiliza un citómetro de flujo. El mismo consiste en un circuito cerrado de alta velocidad de flujo de líquidos que permite alinear y “leer” los espermatozoides individualmente en microgotas. La fluorescencia que produce cada espermatozoide teñido es procesada por un *software* que permite al operador seleccionar la población espermática con mínima o máxima luminosidad, según el sexo que se quiera separar. Los espermatozoides elegidos son cargados eléctricamente, desviados del flujo original en un campo magnético y finalmente recolectados en un tubo para su posterior congelación.

Aproximadamente del 100% de los espermatozoides, un 20% termina colectado en la fracción X, y un 20% en la fracción Y; el 60% restante lo constituyen espermatozoides que no pudieron ser detectados por la técnica, espermatozoides muertos y gotas sin esperma. El semen sexado se presenta comercialmente congelado, en pajuelas de 0,25 ml. Las mismas contienen 2 ó 10 x 10⁶ espermatozoides. La dosis menor se utiliza normalmente en IA y FIV y la mayor en TE. La velocidad de separación que se utiliza actualmente permite obtener 7 pajuelas de 2 x 10⁶ espermatozoides X e igual número de Y por hora^{23,24}.

Para controlar la calidad del semen, se descongela una pajuela por partida y se evalúa la motilidad progresiva y la pureza (proporción del sexo deseado) de las dosis producidas. Las mismas deben tener un mínimo de 35% de espermatozoides con motilidad progresiva y 85% de certeza del sexo para alcanzar los estándares de aprobación¹⁴.

Independientemente de la técnica en que se utilice el semen sexado, los resultados de certeza en el sexo elegido son superiores al 90% y tienen alta repetibilidad. Además, en los trabajos analizados donde se tuvo en cuenta la normalidad de los terneros, no hubo diferencias con los grupos controles provenientes de hembras inseminadas con semen no sexado (convencional), en cuanto a: abortos, mortalidad neonatal, peso al nacer, tasa de mortalidad e incidencia de anomalías ^{3, 4, 18, 19}.

UTILIZACIÓN DEL SEMEN SEXADO EN PROGRAMAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

En primera instancia, por ser la metodología de trabajo más habitual relacionada con el semen sexado, se analizará la información referida a inseminaciones efectuadas sobre celo detectado. Luego se abordarán trabajos más recientes donde se ha empleado semen sexado en programas de inseminación a tiempo fijo (IATF).

Inseminación artificial a celo detectado

En este punto se incluyen trabajos en los que se empleó la inseminación a celo detectado, independientemente de si el celo fue natural o sincronizado.

En 1999 se llevaron a cabo una serie de experimentos para evaluar el comportamiento del semen sexado, fresco y congelado, en la IA de 1370 vaquillonas sincronizadas ¹⁸. Se utilizaron 22 toros de fertilidad desconocida y participaron de la experiencia 6 técnicos experimentados. Las tasas de preñez logradas, utilizando dosis inseminantes de 1 a 1,5 x 10⁶ espermatozoides sexados congelados, fueron entre 10 y 30% inferiores a las obtenidas con los controles, donde se empleó semen convencional, a razón de 20 a 40 x 10⁶ espermatozoides por dosis. Además, la exactitud del sexado promedió 90% y los terneros nacidos resultaron normales. Estos resultados preliminares alentadores motivaron a los investigadores del grupo a la realización de otros estudios tendientes a definir la dosis inseminante óptima y el lugar de descarga del semen más indicado para efectuar la inseminación.

Más recientemente, llevaron a cabo otra serie de experimentos en los que se inseminaron vaquillonas y vacas, utilizando semen congelado en dosis inseminantes que oscilaron entre 1 y 6 millones de espermatozoides sexados, los cuales fueron depositados en el cuerpo del útero o en el tercio medio de ambos cuernos uterinos. Como control, se empleó semen convencional a una dosis de 20 x 10⁶ espermatozoides ²⁰. Cuando se utilizaron dosis que variaron entre 1,5 y 6 x 10⁶ espermatozoides sexados, el porcentaje de preñez resultó similar. Del mismo modo, el lugar donde se efectuó la descarga del

Tabla 1. Resultados de preñez obtenidos a partir de inseminaciones efectuadas con semen sexado y no sexado (convencional), congelado/descongelado utilizando distintas dosis inseminantes y lugares de descarga del semen.

tratamiento		total IA n	preñadas n (%)
experimento 1	1,5x10 ⁶ , sexado	211	113 53,5 ^a
	20x10 ⁶ , convencional	112	75 66,9 ^b
experimento 2	1,5x10 ⁶ , sexado	123	67 54,4 ^a
	4,5x10 ⁶ , sexado	122	62 50,8 ^a
experimento 3	20x10 ⁶ , convencional	126	85 67,4 ^b
	2x10 ⁶ , sexado	38	18 47,3 ^a
experimento 4	6x10 ⁶ , sexado	37	21 56,7 ^{a,b}
	20x10 ⁶ , convencional	40	29 72,5 ^b
experimento 5	3x10 ⁶ , sexado, cuerno	42	21 50,0 ^a
	3x10 ⁶ , sexado, cuerpo	42	24 57,1 ^{a,b}
experimento 5	20x10 ⁶ , convencional	21	16 76,2 ^b
	1x10 ⁶ , sexado, cuerno	119	38 31,9 ^a
	1x10 ⁶ , sexado, cuerpo	123	57 46,3 ^b
	3x10 ⁶ , sexado, cuerno	123	63 51,2 ^b
	3x10 ⁶ , sexado, cuerpo	121	57 47,1 ^b
	20x10 ⁶ , convencional	124	74 59,7 ^c

Fuente: Seidel y Schenk ²⁰. Letras distintas en un mismo experimento, indican diferencias significativas (p<0,05).

semen no modificó los resultados. En cambio, cuando se utilizó la dosis 1 x 10⁶ espermatozoides, el porcentaje de preñez resultó inferior y la descarga del semen en los cuernos uterinos afectó negativamente la tasa de preñez (Tabla 1). En la mayoría de estos experimentos, el porcentaje de preñez obtenido con el semen sexado fue significativamente menor que el logrado con el semen convencional. Factores como condición corporal, edad, manejo reproductivo y sanitario, y eficiencia en la detección de celo, fueron críticos para obtener buenos resultados.

En un trabajo similar, se comparó el porcentaje de preñez en vaquillonas inseminadas con semen sexado con una dosis de 2 x 10⁶ espermatozoides y convencional cuya dosis fue 15 x 10⁶ espermatozoides. El experimento incluyó 9 toros de las razas Holstein, Jersey y Rojo Danesa. Las diferencias en los porcentajes de preñez, siempre a favor del semen convencional, fueron 12%, 7% y 5%, respectivamente ⁴. Tanto las diferencias raciales como las observadas entre toros, no alcanzaron significancia estadística probablemente a consecuencia del bajo número de animales inseminados.

Estudios recientes demostraron que la menor fertilidad que se obtiene con el semen sexado se debe al bajo número de espermatozoides que contiene la dosis inseminante y, en menor medida, al daño causado a los espermatozoides por el proceso de sexado ⁷. Además, los efectos de la baja dosis y del proceso de sexado difieren entre toros.

En Argentina se han realizado pocos estudios comparando los porcentajes de preñez obtenidos luego de inseminar con semen sexado y convencional; en ellos se observó que el porcentaje de preñez promedio ob-

tenido con el semen sexado, resultó un 30% menor al logrado con el convencional^{8,14}.

Inseminación artificial a tiempo fijo

En un experimento donde se evaluó la utilización del semen sexado en un programa de IATF que incluyó 209 vaquillonas Holstein, la sincronización se efectuó mediante la administración de dos dosis de PGF₂α separadas por 14 días¹¹. La inseminación se realizó a las 80–82 h post-2da dosis de PGF₂α utilizándose una dosis de 2 x 10⁶ espermatozoides, proveniente de toros de la misma raza. El semen fue depositado en diferentes sitios: el cuerpo del útero, la mitad de uno de los cuernos, o cerca de la unión útero-tubárica. Para determinar el cuerno donde descargar el semen se utilizó la ultrasonografía, con el objetivo de detectar la presencia de un folículo asumido como preovulatorio. Un hecho importante de este trabajo es que en el momento de la inseminación, las vaquillonas fueron clasificadas según la intensidad del celo, la cual podía ser fuerte o débil.

Los porcentajes de preñez en inseminaciones efectuadas en el tercio anterior del cuerno uterino: 39,3% (24/61) y en el tercio medio: 49,1% (28/57) resultaron similares entre sí y no difirieron de las realizadas en el cuerpo del útero: 41,7% (38/97). En cambio, el porcentaje de preñez de vaquillonas con signos intensos de celo (45,9%) fue superior al de aquellas con signos débiles (20,8%, $p < 0,01$).

En nuestro país se han efectuado estudios sobre semen sexado en IATF únicamente en animales sincronizados con dispositivos a base de progesterona. En uno de estos experimentos se utilizaron 150 vaquillonas Holando Argentino que fueron inseminadas a tiempo fijo con 3 x 10⁶ espermatozoides sexados⁶. Previamente, conformaron 3 grupos idénticos: en el Grupo 1 se utilizó el protocolo tradicional: día 0, colocación del dispositivo + administración de benzoato de estradiol; día 8, retiro del dispositivo + administración de PGF₂α; día 9, administración de benzoato de estradiol; día 10 (hora 52), IATF. En los restantes grupos, se administró media dosis de PGF₂α al colocar el dispositivo, con el objetivo de lograr un mayor control de la dinámica folicular, manteniendo el mismo horario para la IATF (Grupo 2) ó posponiéndola hasta la hora 60 (Grupo 3). Los porcentajes de preñez de los Grupos 1, 2 y 3 fueron similares: 44%, 36% y 40%, respectivamente.

Un trabajo reciente involucró 158 vaquillonas vírgenes, raza Hereford de 19 meses de edad¹². Las mismas fueron divididas al azar en dos grupos. Al Grupo 1 se lo sincronizó para ser inseminado a tiempo fijo, con un dispositivo liberador de progesterona, más la inyección al mismo tiempo de 0,021 mg de GnRH. Siete días después, el dispositivo fue retirado inyectando al mismo tiempo 150 ug de PGF₂α. A las 67–68 h posteriores al retiro del dispositivo se procedió a la inseminación junto a la inyección de 0,021 mg de GnRH (Subgrupo 1A) y a las restantes se les inyectó 0,0105 mg de GnRH,

(Subgrupo 1B). El Grupo 2 fue sincronizado con 2 dosis de PGF₂α con 11 días de intervalo entre ambas, y se realizó detección de celo e inseminación durante 5 días utilizando el sistema AM/PM.

Todas las vaquillonas fueron inseminadas con 2 x 10⁶ espermatozoides sexados. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía a los 30 días post inseminación. En el porcentaje de preñez, no se registraron diferencias entre ambos subgrupos del Grupo 1: 54,7 y 55% para los subgrupos 1A y 1B, respectivamente; no observándose a su vez diferencias entre el Grupo 1: 54,9% y el Grupo 2: 52,6%.

UTILIZACIÓN DEL SEMEN SEXADO EN PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La combinación de superovulación y TE utilizando semen sexado, permite diseñar estrategias cuando se comercializan animales de alto valor genético o cuando se desea conformar un núcleo genético más rápidamente. Existen diferentes trabajos donde se evaluó la utilización del semen sexado en donantes incluidas en programas de TE.

Se ha reportado el comportamiento de diferentes dosis inseminantes de semen sexado y convencional, en vaquillonas y vacas donantes de embriones en las cuales la inseminación se efectuó en el cuerpo del útero²². En un primer experimento en el que se utilizaron vaquillonas y vacas Angus y semen de dos toros de la misma raza, compararon dos dosis de semen sexado (2 y 10 millones de espermatozoides) con una dosis de semen convencional de 40 millones de espermatozoides, procediendo a realizar dos inseminaciones, a las 12 y 24 h de haber detectado celo mediante observación visual. El porcentaje de ovocitos fecundados y el número de embriones transferibles obtenidos con ambas dosis de semen sexado fue similar y resultó menor que el logrado con semen convencional ($p < 0,05$; Tabla 2).

En el segundo experimento, en el que se utilizaron vaquillonas Holstein y tres toros de la misma raza, compararon dos dosis de semen sexado (2 y 20 millones de espermatozoides) con semen convencional (40 millones de espermatozoides), procediendo a realizar una inseminación a tiempo fijo, 70–72 h post-administración de PGF₂α. El porcentaje de ovocitos fecundados difirió en las tres dosis inseminantes ($p < 0,05$). El número de embriones transferibles de la menor dosis de semen sexado difirió del obtenido utilizando semen convencional ($p < 0,05$), en cambio la dosis mayor de semen sexado no difirió de la dosis de semen convencional utilizada (Tabla 2). Los embriones de este experimento fueron transferidos en fresco y congelados-descongelados. Con el semen convencional, los porcentajes de preñez obtenidos fueron 63 y 89%, respectivamente. Para el caso del semen sexado dichos porcentajes fueron 67 y 40% respectivamente, resultando similares.

Por su parte, en la Universidad Nacional de Córdoba, se diseñaron tres experimentos para evaluar el uso

Tabla 2. Ovocitos fecundados y embriones transferibles en donantes inseminadas con semen sexado y convencional, congelado/descongelado.

esquema de IA	tipo de semen y número de espermatozoides por dosis	n	ovocitos fecundados (%) (n)	embriones transferibles (%) (n)	bibliografía
experimento 1 (2 insemin., 12 y 24 h post–detección celo)	S.S. (2x10 ⁶)	30	40±6,0 ^a	3,3±0,9 ^a	Schenk y cols. ²²
	S.S. (10x10 ⁶)	30	49±6,0 ^a	4,1±0,9 ^a	
	S.C. (40x10 ⁶)	29	69±6,1 ^b	8,7±0,9 ^b	
experimento 2 IATF (70–72 h post–2da PGF2α)	S.S. (2x10 ⁶)	31	28±7,1 ^a	1,3±0,5 ^a	
	S.S. (20x10 ⁶)	34	49±6,8 ^b	2,0±0,5 ^b	
	S.C. (40x10 ⁶)	33	72±6,9 ^c	3,1±0,5 ^b	
experimento 1 IATF (12 y 24 h post LH)	S.S. (10x10 ⁶)	12	0,58±0,34	0,58±0,34	
	S.C. (10x10 ⁶)	12	4,08±1,94	3,58±1,85	
experimento 2 IATF (12, 18 x 2 y 24 h post GnRH)	S.S. (10x10 ⁶)	5	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	Balla y cols. ¹
	S.C. (10x10 ⁶)	5	6,00±2,00 ^b	5,60±2,09 ^b	
experimento 3 celo detectado SS: (12, 18 x 2 y 24 h post GnRH) y SC: (12 y 24 h post GnRH)	S.S. (10x10 ⁶)	5	0,40±0,24	0,40±0,24	
	S.C. (10x10 ⁶)	5	5,80±2,15	5,60±2,25	
experimento 1 (2 insemin., 12 y 24 h post–detección celo)	S.S. (5x10 ⁶)	5	78,2±11,0	53,4±11,6	Hayakawa y cols. ⁹
	S.C. (5x10 ⁶)	5	94,7±2,5	68,1±9,7	
experimento 2 (2 insemin., 12 y 24 h post–detección celo)	S.S.F. (5x10 ⁶)	10	91,3±4,5	59,5±9,3	
	S.S.C. (5x10 ⁶)	9	96,3±2,5	69,0±8,9	
	S.C. (5x10 ⁶)	26	91,1±3,4	70,3±4,9	

S.S.: Semen sexado; S.C.: Semen convencional; S.S.F.: Semen sexado fresco; S.S.C.: Semen sexado congelado.

Valores expresados como promedio ± EE. Letras diferentes en la misma columna de un mismo experimento indican diferencias significativas (p<0,05).

de semen sexado en protocolos de superestimulación en vacas Holstein ¹. Utilizaron 44 vacas (20 en producción y 24 secas) y en cada experimento aplicaron un protocolo diferente de superestimulación, en donde variaron la administración o no de eCG y la utilización de LH o GnRH. Tanto en el primero como en el segundo experimento, la inseminación fue realizada a tiempo fijo, no así en el último en donde se realizó a celo detectado. En todos los casos, la dosis inseminante fue de 10 millones de espermatozoides. Los resultados de cada experimento se muestran en la Tabla 2. En este trabajo, se demostró que con la utilización de semen sexado con 10 millones de espermatozoides por dosis, se obtiene menor cantidad de ovocitos fecundados que con el semen convencional (0,41±0,19 vs 4,91±1,22) y también menos embriones transferibles (0,41±0,19 vs 4,5±1,2, p<0,01).

En un trabajo realizado con animales incluidos en programas comerciales de transferencia embrionaria, se efectuaron tres ensayos utilizando diferentes esquemas de inseminación y dosis de semen sexado ⁹. En el primer ensayo utilizaron vaquillonas que fueron inseminadas con semen sexado y convencional 12 y 24 horas luego de haber sido detectadas en celo, utilizando 5 x 10⁶ espermatozoides en cada inseminación. Los porcentajes de ovocitos fecundados y de embriones transferibles fueron similares para semen sexado y convencional (Tabla 2), no obstante, el número de embriones transferibles fue menor para semen sexado.

En el segundo ensayo, vaquillonas fueron inseminadas utilizando el mismo esquema e igual dosis que en el ensayo anterior, comparando semen sexado fresco con semen sexado congelado. La producción de embriones para ambos tratamientos fue similar y no difirió de aquella obtenida con semen convencional (Tabla 2). Cuando los embriones fueron transferidos, el porcentaje de preñez obtenido con aquellos provenientes de semen sexado (70,4%) fue similar al logrado con el de los provenientes de la utilización de semen convencional (72,4%).

En el tercer ensayo, se utilizó exclusivamente semen sexado congelado en vaquillonas y vacas. Se comparó un esquema de simple inseminación, 18–24 horas post detección de celo con 5 x 10⁶ espermatozoides con esquemas de doble inseminación, 12 y 24 horas post detección de celo, en los que se utilizaron dosis de 2, 5 y 10 x 10⁶ espermatozoides en cada inseminación. La conclusión a la que se llegó es que el esquema de inseminación con dos dosis de 5 x 10⁶ espermatozoides resulta el más apropiado tanto para vaquillonas como para vacas. No obstante, para nuestro país la empresa que produce semen sexado propone un esquema de inseminación diferente. Recomienda utilizar cuatro dosis de 10 x 10⁶ espermatozoides cada una e inseminar al momento de detectar el celo, a las 12 h con dos dosis y por último, a las 24 h. Además, se debe tener en cuenta la historia reproductiva de la hembra en el momento de elegir la donante, ya que no se usa semen sexado en

Tabla 3. Resultados de diferentes trabajos en los que se utilizó semen sexado congelado/descongelado de diferentes toros en programas de fertilización *in vitro*.

semen	dosis inseminante	ovocitos inseminados (n)	blastocistos producidos (%)	bibliografía
S.S. Toro A	1x10 ⁶	184	3,2 ^a	
S.S. Toro A	2x10 ⁶	54	5,5 ^a	
S.C. Toro A	1x10 ⁶	436	26,3 ^b	Medina y cols. (2002)
S.S. Toro B	1x10 ⁶	304	4,0 ^a	
S.S. Toro B	2x10 ⁶	83	12,0 ^b	
S.C. Toro B	1x10 ⁶	345	28,8 ^c	
S.S. Toro A		310	4,9 ^a	
S.S. Toro B		300	0,0 ^a	
S.S. Toro C		320	0,0 [*]	
S.S. Toro D	1x10 ⁶	310	3,5 ^a	Palma y cols. (2007)
S.S. Toro E		302	–	
S.S. Toro F		302	25,8 ^b	
S.C. (control)		330	33,6 ^b	
S.S. Toro A		137	12,7	
S.S. Toro B	2x10 ⁶	195	17,5	Blondin y col. (2009)
S.S. Toro C		155	8,8	

S.S.: Semen sexado; S.C.: Semen convencional.

Letras diferentes difieren significativamente ($p < 0,05$) dentro de cada toro, Medina y cols.¹⁴; entre toros, Palma y cols.¹⁶. * excluido del análisis estadístico por no presentar desarrollo embrionario.

vacas que vienen de dos o tres colectas negativas, es decir, sin producir embriones viables con semen convencional¹⁷.

UTILIZACIÓN DE SEMEN SEXADO EN PROGRAMAS DE FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

La utilización de semen sexado en la producción *in vitro* de embriones permite disminuir el tiempo en el que se logran determinados objetivos, por ejemplo, mejorar la calidad del rodeo e incrementar el número de animales que lo integran. Dado que los resultados que se obtienen son variables, diversos investigadores han efectuado estudios tendientes a mejorar las tasas de división y la calidad embrionaria. Los aspectos que se han tenido en cuenta son: maduración de los ovocitos, proceso de sexado, concentración espermática, cultivo de los embriones y criopreservación de los mismos²⁵.

A continuación se detallan diversos trabajos, en los que se presentan resultados obtenidos con semen sexado en la producción *in vitro* de embriones.

En un estudio se utilizaron ovocitos obtenidos a partir de ovarios de matadero y diferentes dosis de semen sexado y convencional proveniente de dos toros Holando Argentino¹⁴. La concentración de semen utilizada fue de 1 o 2 x 10⁶ espermatozoides para semen sexado y 1 x 10⁶ espermatozoides para semen convencional. La tasa de fertilización obtenida con semen sexado, aún con la mayor dosis utilizada, fue menor que con el semen convencional: toro A, 31% versus 77,3% y toro B, 52% versus 78,5%, respectivamente ($p < 0,05$). El desarrollo embrionario con semen sexado fue más bajo que

con semen convencional, independientemente del toro y de la concentración espermática utilizada ($p < 0,05$; Tabla 3).

En otro trabajo se empleó semen sexado de 6 toros Holstein para estudiar su eficiencia en un programa de producción *in vitro* de embriones y comparar la ultraestructura de estos embriones con la de aquéllos producidos con semen convencional¹⁶. Los ovocitos (n: 1852) provenientes de animales de matadero, fueron divididos en 6 grupos y fecundados con semen sexado de 6 toros Holstein o con semen convencional (n: 330 ovocitos) de un toro control. Las tasas de división y desarrollo a blastocistos fueron determinadas a los 2 y 7 días post-inseminación, respectivamente. Cuando se utilizó semen sexado, se observó una frecuencia significativamente alta de sesiones contaminadas.

La cantidad de ovocitos fecundados en cada gota, fue significativamente más baja con semen sexado ($p < 0,05$). La tasa de división con el semen sexado fue muy variable; con algunos toros se obtuvieron tasas que no difirieron del grupo control,

mientras que con otros las diferencias fueron altamente significativas. Una situación similar se observó cuando se analizó la producción de blastocistos (Tabla 3).

Por último, los estudios ultraestructurales indicaron que algunos blastocistos producidos con semen sexado presentaron más desviaciones en el número y estructuras de sus organelas, así como más envolturas nucleares dañadas que los blastocistos del grupo control. En base a los resultados, se concluyó que la tasa aceptable de blastocistos obtenida en uno de los grupos, indica que el semen sexado puede ser utilizado en la producción *in vitro* de embriones¹⁶. Sin embargo, la alta variabilidad de los resultados, la alta tasa de contaminación, la reducida capacidad fecundante y las alteraciones estructurales, indican que se requieren mejoras adicionales para minimizar el daño de los espermatozoides durante el proceso de separación y conservación, para su aplicación con éxito en un programa comercial.

En otro ensayo se evaluó el efecto del semen sexado, congelado–descongelado en la producción *in vitro* de embriones¹⁵. El estudio involucró 16 partidas provenientes de 4 toros. Los ovocitos fueron recolectados de vacas Nelore por aspiración folicular e inseminados con semen sexado a una dosis de 1 x 10⁶ espermatozoides. La cantidad de embriones viables difirió entre toros con 26,4%, 28,3%, 32,9% y 36,8% de blastocistos producidos para cada uno ($p < 0,05$). Paralelamente, se observó un efecto de las diferentes partidas de semen congelado/descongelado de cada toro, con valores extremos de 10,3 y 32,9% para el toro A, 9,7 y 38,0% para el toro B, 23,0 y 34,6% para el toro C y 13,3 y 66,7% para el toro D ($p < 0,01$).

En busca de determinar las mejores condiciones para producir un alto porcentaje de blastocistos *in vitro*, se analizó el uso de cuatro tipos de semen (sexado, fresco y congelado, en una dosis de 1×10^6 espermatozoides totales y convencional, fresco y congelado, con una concentración final de 2×10^6 espermatozoides) provenientes de tres toros Holstein². En este trabajo se evaluaron las tasas de división y de desarrollo hasta blastocisto; paralelamente, los autores analizaron si el sexado del semen provocaba daños en el ADN de los embriones.

La tasa de división embrionaria obtenida con semen sexado ($80,6 \pm 3,2$) fue mayor que la lograda con semen convencional ($68,2 \pm 4,5$; $p < 0,01$); no obstante, los resultados fueron inversos cuando se analizó el porcentaje de blastocistos ($10,6 \pm 4,5$ vs. $22,2 \pm 3,3$, respectivamente; $p < 0,01$). A su vez, los resultados del trabajo demostraron un efecto significativo del toro sobre la tasa de división embrionaria ($p < 0,05$); no así sobre la producción de blastocistos (Tabla 3).

Con respecto al análisis sobre motilidad, surgió que la misma fue mayor en el semen convencional fresco que en el sexado, congelado–descongelado ($p < 0,05$). A su vez, el semen fresco (sexado o convencional), mostró menor porcentaje de espermatozoides con daños en sus membranas y menor actividad mitocondrial al compararlo con semen congelado (sexado o no sexado). Basado en ello, los autores postulan que el hecho de estar afectada la calidad espermática tanto por el proceso de congelación como por el sexado, explicaría en parte la escasa proporción de blastocistos que se obtiene cuando se utiliza semen sexado congelado. Otro dato interesante que mostró este trabajo, es que el semen sexado no incrementó el daño del ADN al compararlo con el convencional, lo que indicaría que el proceso en sí, no induce daños en el mismo.

La técnica de fertilización *in vitro* permite analizar diversos factores que podrían afectar en forma negativa los resultados de la utilización de semen sexado en dicho proceso. Uno de los aspectos estudiados es la concentración de heparina que se utiliza durante la capacitación espermática dado que aún la concentración ideal para obtener óptima cantidad de blastocistos necesita ser ajustada^{2,13}. El factor mencionado anteriormente, adquiere relevancia sobre todo considerando que los espermatozoides que son sometidos al proceso de sexado están sujetos a condiciones que pueden inducir su capacitación en forma diferente a aquellos no sexados²¹.

CONCLUSIONES

– La utilización de semen sexado en programas de IA a celo detectado, realizadas en el cuerpo del útero, utilizando dosis variables entre $1,5$ y 6×10^6 espermatozoides, permite lograr porcentajes de preñez que resultan entre 5 y 35% inferiores a los obtenidos con semen convencional. La utilización de semen sexado en IATF es más reciente, no obstante los resultados obtenidos

son alentadores ya que se han logrado porcentajes de preñez similares a los registrados inseminando a celo detectado.

– En programas de TE, el semen sexado se ha utilizado tanto en inseminaciones a celo detectado como en IATF; en la mayoría de estos trabajos se han obtenido resultados inferiores a los logrados con el semen convencional. El hecho que se haya variado de manera considerable el número de inseminaciones y las dosis utilizadas en cada caso impide definir aún un protocolo de trabajo recomendable para el semen sexado.

– En programas de FIV, el semen sexado ha sido utilizado para fecundar ovocitos provenientes tanto de ovarios de matadero como de animales vivos. El porcentaje de blastocistos obtenido con el semen sexado resultó siempre inferior al logrado con semen convencional. Respecto a dicho porcentaje, un aspecto importante a destacar es el rango de variabilidad observado en el semen sexado (0 a 25,8%), respecto al convencional (26,3 a 33,6%).

– En síntesis, es factible utilizar el semen sexado en programas de IA, TE y FIV; no obstante, los resultados generalmente son inferiores a los que se obtienen con semen convencional y son afectados por numerosos factores. Su conocimiento y control, sumados a avances en la metodología de sexado permitirán mejorar la situación actual de la técnica.

REFERENCIAS

1. Balla E, Tribulo H, Barberis F, Tribulo R, Barberis S, Reano I, Martínez MF, Bó GA. 2007. Utilización de semen sexado en protocolos de superestimulación en vacas Holstein. *Resúmenes del VII Simposio Internacional de Reproducción Animal*, IRAC, Córdoba (Argentina), p. 287.
2. Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King W. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71: 30–38.
3. Bodmer M, Janett F, Hassig M, Den Daas N, Reichert P, Thun R. 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64: 1647–1655.
4. Borchersen S, Peacock M. 2009. Danish A.I. field data with sexed semen. *Theriogenology* 71: 59–63.
5. Cantarelli Pegoraro LM, Rheingantz MG, Palma GA. 2008. Selección del sexo en mamíferos. En: *Biotecnología de la Reproducción* (Palma GA Ed), 2ª ed., Repro Biotec, Mar del Plata, p. 415–446.
6. Cutaia LE, Veneranda G, Bo G. 2007. Semen sexado, una herramienta tecnológica para el tambo. *Producir XXI* (Buenos Aires) 15: 52–57.
7. Frijters AC, Mullaart E, Roelofs RM, Van Hoorne RP, Moreno JF, Moreno O, Merton JS. 2009. What affects of sexed bull semen more, low sperm dosage or sorting process?. *Theriogenology* 71: 64–67.

8. **González M, Vizca H, Cabodevila J, Callejas S.** 2003. Evaluación de los porcentajes de preñez y de la eficiencia de sexado en la inseminación artificial de vaquillonas (Jersey y cruce F1 Jersey–Holando Argentino) con semen sexado congelado–descongelado. *Tesina, orientación Producción Animal, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA*, Tandil, Argentina, 28 p.
9. **Hayakawa H, Iría T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagy Y.** 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm *Theriogenology* 71: 68–73.
10. **Johnson LA, Flook JR, Hawk HW.** 1989. Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y spermatozoa separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 41: 149–163.
11. **Kurykin J, Jaakma U, Jalakas M, Aidnik M, Waldmann A, Majas L.** 2007. Pregnancy percentage following deposition of sex–sorted sperm and different sites whiting the uterus in estrus–synchronized heifers. *Theriogenology* 67: 754–759.
12. **Lagioia JJ, Loguercio JE, Yuong S, Basualdo M, Feula P, Santarena A, Panarace M, Medina MJ.** 2008. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen sexado en vaquillonas. *Taurus* 39: 22–25.
13. **Lu KH, Seidel GE.** 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with fluor cytometrically–sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819–830.
14. **Medina M, Cattaneo L, Caballero J, Cerrate H, Panarace M, Ferré L, Dalla Lasta M.** 2002. Semen sexado y congelado en Argentina. Resultados de su utilización en programas de inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *Taurus* 13: 4–8.
15. **Oliveira Filho BD, Sanches B, Santos F, Pontes J, Gambarini ML, Ereno A, Basso A, Ferreira CR.** 2008. Effect of the ejaculate and bull on *in vitro* embryo production using sexed semen of Nelore (*Bos indicus*). *Proceedings of 16th International Congress on Animal Reproduction*, Budapest (Hungary) p.195–196.
16. **Palma GA, Olivier N, Neumuller C, Sinowatz F.** 2007. Efecto del semen sexado por medio de citometría de flujo sobre la eficiencia de la fecundación *in vitro* y la ultraestructura de blastocistos producidos *in vitro*. *Resúmenes del VII Simposio Internacional de Reproducción Animal*, IRAC, Córdoba (Argentina), p. 205.
17. **Panarace M.** 2008. Semen sexado: resultados, impacto económico y perspectivas futuras para su implementación en rodeos de carne y de leche. *Resúmenes IV Jornadas Taurus de Reproducción Animal*, Buenos Aires (Argentina), p.70–78.
18. **Seidel GE, Schenk JL, Herickhoff SP, Doyle SP, Brink Z, Green RD, Cran DG.** 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52: 1407–1420.
19. **Seidel GE.** 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68: 443–446.
20. **Seidel GE, Schenk JL.** 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim Reprod Sci* 105: 129–138.
21. **Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel GE.** 1999. Cryopreservation of flow–sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52: 1375–1391.
22. **Schenk JL, Suh TK, Seidel GE.** 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65: 299–307.
23. **Schenk JL, Cran DG, Everet RW, Seidel GE.** 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effect of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71: 717–728.
24. **Sharpe JC, Evans KM.** 2009. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 71: 4–10.
25. **Xu J, Chaubal S, Du F.** 2009. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 71: 39–47.