

# Primer sexaje de embriones bovinos en España

Miguel Alcaide Guindo

Doctor veterinario. Departamento de MOET (Tauste Ganadera, S.A.)

**E**l interés en determinar el sexo de los embriones de vacuno lechero ha sido comentado y discutido en numerosas ocasiones. Además del interés científico por poner en práctica una técnica de sexaje fiable, hay que comentar que en la industria lechera este interés se debe al beneficio económico que puede ejercer una técnica que permita determinar el sexo del embrión antes incluso de que se produzca la gestación.

Gracias al desarrollo científico de varias técnicas laboratoriales y a su utilización conjunta, ya existe una técnica de sexaje embrionario lo suficientemente fiable y rápida como para instaurarla a nivel práctico.

La técnica de sexaje descrita en esta publicación está siendo utilizada comercialmente en algunos países de Europa y los resultados obtenidos parecen demostrar una altísima fiabilidad de la misma.

El sistema de sexaje utilizado se basa en la biopsia del embrión y la utilización de una sonda de ADN que mediante la "Reacción de Cadenas de Polimerasa (PCR)" y la "Electroforesis" nos permite la detección del cromosoma "Y", en aquellos embriones de sexo masculino.

Las muestras obtenidas mediante biopsia fueron sometidas a liberación y posterior amplificación de su ADN, para más tarde y mediante electroforesis, proceder a la determinación del sexo según la visualización mediante rayos ultravioleta de la presencia o ausencia de las bandas correspondientes al cromosoma Y.

Todo el proceso de manipulación requiere un tiempo

aproximado de cuatro a cinco horas. Durante este periodo de tiempo, los embriones pueden mantenerse en cultivo hasta su posterior transferencia en fresco o bien pueden transferirse nada más haber finalizado la biopsia de los mismos.

## MATERIAL Y METODOS

Los días 23 y 24 de mayo de 1991 tuvieron lugar en las instalaciones de Tauste Ganadera S.A. las "Primeras Jornadas Técnicas sobre Transferencia y Sexaje de Embriones en Ganado Vacuno", llevadas a cabo en el territorio español.

La puesta en práctica de tan novísima tecnología pudo realizarse gracias a la colaboración de la Diputación General de Aragón y el CENSYRA de Movera y al trabajo del equipo técnico del Departamento de MOET de Tauste Ganadera, S.A., que fue el encargado de llevar a cabo los trabajos de recolección y transferencia de los embriones sometidos a biopsia y sexaje mediante la técnica empleada por los técnicos de la empresa de nacionalidad francesa France Embryon.

Un total de 16 embriones en estadio de blastocisto de vacuno lechero pura raza Holstein se recolectaron mediante "flushing" del útero de las donadoras que habían sido superovuladas a partir del decimo primer día del ciclo sexual mediante inyecciones seriadas de "HMG".

El "flushing" se realizó el octavo día después del celo de las correspondientes donadoras, las cuales habían sido previamente inseminadas artificialmente a las 12 y 24 horas del celo post-superovulatorio.

Una vez recolectados, los embriones fueron lavados en PBS estéril durante diez pasos sucesivos y posteriormente fueron clasificados y calificados según su morfología con la ayuda de un microscopio de contraste de fases con óptica "Normasky" (Nikon).

Todos los embriones utilizados en esta primera experiencia fueron calificados como blastocistos viables de calidad excelente (calidad 1), siendo sometidos posteriormente a la biopsia y cultivo hasta su transferencia en fresco una vez determinado el sexo de cada uno de ellos.



Biopsia embrionaria mediante micromanipulador automático conectado al microscopio invertido.

Cada embrión destinado a sexaje se trasvasó a una de las 4 a 5 microgotas de 5 microlitros contenidas en una placa de "Petri" preparadas para la biopsia de los embriones. El medio de las microgotas contenía PBS 0,25 M de sacarosa (sacarosa) libre de Ca y Mg y carente de proteína. Todas las microgotas se recubrieron con aceite de parafina (Sigma). Este medio provoca la fijación de los embriones al fondo de la placa, evitando la necesidad de sujeción de los mismos con otro micromanipulador.

La biopsia de los embriones se realizó mediante la utilización de un microscopio invertido (Nikon) dotado de un micromanipulador con un dispositivo de manipulación automático o "joy-stick" (AB Technology) al cual se le había armado de una micro cuchilla para proceder a la biopsia de los embriones a sexar.

La biopsia se realizó en el borde del blastocisto, evitando así dañar el botón embrionario del mismo. Producido el corte embrionario, se inyectó una cantidad de 10 µl de PBS modificado que contenía 4 g/litro de Albúmina Sérica Bovina (BSA), lo que permite la desfijación del material embrionario del fondo de la placa de "Petri" y por tanto su extracción y manipulación mediante la correspondiente micropipeta.

Una vez realizada la biopsia embrionaria, los embriones se transvasaron a un medio de cultivo ordinario sobre platina calentable donde se cultivaron a 37 °C. hasta su posterior transferencia (unas cuatro horas más tarde) una vez detectado el sexo de los mismos.

La escasa cantidad de células extraídas durante la biopsia sirvieron como muestras celulares para el análisis del ADN de las mismas, para lo cual se sometieron a su liberación y desnaturalización mediante choque térmico a una temperatura de -196 °C. y posterior centrifugación a 12.000 rpm., tras lo cual se las sometió a una ebullición de 115 °C. durante siete minutos.

Liberado el ADN de las biopsias embrionarias éstas se sometieron a la "Reacción de Cadena de Polimerización (PCR)" en un volumen de una solución de 10 microlitros que contiene entre otros componentes cantidades concretas de KCl, Tris, HCl, Cl<sub>2</sub>Mg, nucleótidos y la polimerasa que permitirá la

amplificación del ADN de las muestras en un amplificador (Perkin Elmer-Cetus DNA Thermal Cycler), junto con las muestras se amplifican los controles neutro, macho y hembra correspondientes.

Las temperaturas óptimas para la amplificación son de 94 °C. (34 ciclos) y fijación del ADN mediante ciclos de elongación de 2 minutos de duración.

Realizada la amplificación del ADN durante 135 minutos, se analiza para la detección del sexo mediante electroforesis en su correspondiente campana electroforética (BIO Red Model 200/2.0) sobre gel de agarosa a 100 voltios durante 10 minutos, tras lo cual se visualizan las bandas de ADN mediante exposición de las mismas en rayos ultravioleta y se comparan las mismas con los controles neutro, macho y hembra.

Una vez determinado el sexo de cada uno de los embriones, estos se envasaron individualmente en pajuelas francesas (modelo IMV) de 0,25 ml de volumen y se transfirieron vía quirúrgica a novillas nuligestas que habían sido previamente sincronizadas y que se encontraban en el octavo día de ciclo sexual.

El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación rectal 25 días después de realizada la transferencia.

## RESULTADOS

Los resultados que aquí exponemos son tan solo preliminares y están pendientes de la contrastación del sexo de los animales resultantes de las gestaciones obtenidos al término de las mismas.

De los 16 embriones sometidos a biopsia y posterior determinación del sexo, todos pudieron ser sexados mediante la técnica explicada, obteniéndose un resultado laboratorio de 9 embriones de sexo femenino y 7 de sexo masculino.

En esta primera experiencia, los 16 embriones sexados se transfirieron una vez finalizado el sexaje de los mismos mediante el método no quirúrgico a 16 novillas nuligestas de 17 meses de edad. De los 16 embriones transferidos se han confirmado 10 gestaciones, lo que supone una fertilidad del 62,5 %.

De los 9 embriones de sexo femenino transferidos se han obtenido 7 gestaciones, habiéndose obtenido 3 gestaciones de los 7 embriones de sexo masculino transferidos.

La confirmación del sexo de los animales que resulten de estas gestaciones se producirá con el nacimiento de los mismos y será entonces cuando podamos afirmar que los resultados del sexaje laboratorio se corresponden con los obtenidos en la práctica.

## DISCUSION

Los embriones transferidos habían sido calificados antes de someterles a biopsia como de calidad excelente (calidad 1). El porcentaje de fertilidad obtenido tras su biopsia y posterior cultivo fué de un 62,5 %, si comparamos este porcentaje de fertilidad con el obtenido normalmente en la misma ganadería durante el año 1990, que fue de un 74 % cuando se transfirieron embriones en fresco y de calidad excelente a novillas nuligestas, se observa una disminución de un 11,5 %.

El pequeño descenso obtenido en la fertilidad no es estadísticamente significativo, debido probablemente al escaso número de embriones transferidos una vez sexados, lo que no significa que se aprecie un descenso en la fertilidad, que muy probablemente sea debido al daño ejercido sobre el embrión mediante la biopsia y a su cultivo posterior durante 4-5 horas.

En nuestra experiencia se transfirieron todos los embriones una vez se había determinado el sexo de los mismos, lo que se debió a la necesidad de averiguar el grado de fiabilidad en la predicción del sexo de los mismos. Una vez que el grado de fiabilidad haya demostrado ser elevado se deberán llevar a cabo tan solo las transferencias de los embriones de sexo deseado.

Para evitar en lo posible un descenso del porcentaje de fertilidad debido al periodo de espera al que se someten los embriones hasta la determinación de su sexo, se podría realizar la transferencia de los embriones en fresco nada más haber realizado la biopsia. De este modo, se determinaría el sexo del embrión después de haberle transferido, obteniéndose muy probablemente unos resultados de fertilidad muy similares a los que se obtienen

cuando se emplean embriones frescos no micromanipulados.

Las gestaciones de sexo no deseado se podrían evitar mediante la inyección intramuscular de una dosis de protaglandina F2 alfa a la receptora que hubiera recibido un embrión de sexo no deseado. Si utilizamos este sistema tan sólo se perderían 9 días de ciclo en la receptora correspondiente, lo que reduciría en gran parte las pérdidas ocasionadas por el retraso en la lactación de la receptora.

La embriocentesis apoyada del sexaje podría apoyar aún más la instauración de esta técnica a nivel de campo. A este respecto, es necesario comentar que cuando se realiza las embriocentesis se obtienen dos mitades del embrión micromanipulado y en numerosas ocasiones también se obtiene la liberación de un número de células embrionarias que podrían ser las empleadas para la determinación del sexo del embrión en cuestión. De esta forma se podría incrementar el número de gestaciones del sexo deseado.

La transferencia de embriones ya ha demostrado su eficacia y ha dado numerosos frutos en los países occidenta-

les. Si además se apoya con la tecnología del sexaje su proyección puede llegar a ser de tal envergadura que sería muy comparable al desarrollo ejercido en su día por la inseminación artificial.

Esta nueva tecnología, si se instaura como técnica habitual, puede producir un elevado beneficio económico en el sector del ganado vacuno lechero, ya que tan solo se obtendrían gestaciones de sexo femenino, con lo que el número de hembras se reduciría en más de un 50% (se evitarían los partos gemelares de macho y hembra).

**CONCLUSIONES**

La técnica del sexaje embrionario es hoy en día una realidad palpable, ya que puede ser realizada sin demasiado esfuerzo a nivel de campo.

Los niveles de gestación que se obtienen después de someter a la determinación del sexo a los embriones parecen no disminuir significativamente la fertilidad de los mismos.

Es necesario esperar todavía un tiempo prudencial para analizar los datos que esta nueva técnica vaya aportando al mundo ganadero.

La técnica del sexaje embrionario si se apoya de las técnicas asociadas, tales como la embriocentesis, clonación y microinyección puede producir una mejora en los diferentes sectores ganaderos tan importante o superior a la ejercida por la inseminación artificial.

**BIBLIOGRAFIA**

BONDIOI, K.R., ELLIS, S.B., PRYOR, J.H., WILLIAMS, M.W. AND HARPOLD, M.M. *The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos.* Theriogenology 31: 95-104 (1989).

HERR, C.M. AND REED, K.C. *Micromanipulation of Bovine Embryos for sex determination.* Theriogenology 35-1: 45-54 (1991).

HERR, C.M., MATTHAEI, K.L., STEEL, T. AND REED, K.C. *Rapid Y-chromosome assay of peripheral blood lymphocytes from Bovinae of a known phenotypic sex.* Theriogenology 33: 246 Abstr. (1990).

JESTIN, A., FOULON, T., BLANCHARD, P. *Amplification enzymatique du gène par PCR: application à la détection du virus de la maladie d'Aujeszky.* Le point Vétérinaire, vol 21, n.º 124. Octobre-novembre (1989).

MATTHAEI, K.L., HERR, C.M., BRADLEY, M.P. AND REED, K.C. *Analysis of sex chromosome constitution of single bovine spermatozoa by polymerase chain reaction (PCR).* Theriogenology 33: 285 Abstr (1990).

**ENCUENTRO PRODUCCION ANIMAL**

**TIER & TECHNIK es el mercado mundial de la zootécnica y de la técnica de producción. Más de 850 exhibidores de todo el mundo le esperan. Aproveche la oportunidad de conocer la amplia oferta de los proveedores internacionales de técnica, medios de producción y animales.**

**Prepare bien su visita.** Pida ya ahora su ejemplar del catálogo oficial y de la lista de novedades al precio de 25 Marcos Alemanes. La entrega tendrá lugar a finales de Octubre de 1991.



**TIER & TECHNIK '91**

DLG Exposición internacional especializada para la producción animal, Francfort del Meno. Recinto ferial, del 26 al 30 Noviembre de 1991



Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft  
Zimmerweg 16, W-6000 Frankfurt am Main 1  
Teléfono: 0 69/7 16 80  
Telex: 4 13 185 dlG d  
Telefax: 0 69/7 24 15 54

Si, envíeme la Lista de Novedades ( en alemán,  en inglés,  en francés) y el Catálogo TIER & TECHNIK al precio de 25 Marcos Alemanes. 30

Pago  factura  adjunto cheque

tarjeta de crédito  VISA  Euro/ Master Card  American Express

número de tarjeta \_\_\_\_\_ tarjeta válida hasta \_\_\_\_\_

nombre \_\_\_\_\_

dirección \_\_\_\_\_

código postal \_\_\_\_\_ lugar \_\_\_\_\_ país \_\_\_\_\_

fecha \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Si ríbase mandarla a: Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, Zimmerweg 16, W-6000 Frankfurt/M. 1