

El sexaje de embriones bovinos

Miguel Alcaide Guindo

Doctor Veterinario. Departamento de MOET. Tauste Ganadera

El avance de la biotecnología genética en estos últimos años está siguiendo un ritmo muy acelerado debido en gran manera a la utilización de la técnica de duplicación del ADN, lo que se consigue con la internacionalmente conocida como técnica «PCR» (Bondioli *et al.*, 1989), que corresponde a las iniciales inglesas de la técnica de «Polymerase Chain Reaction» (Reacción de Cadenas de Polimerasa).

Esta tecnología permite realizar el estudio de numerosos aspectos genéticos, entre los cuales se encuentra la determinación del sexo de los embriones, que permite conocer su sexo antes de la transferencia. La posibilidad de determinar el sexo de los embriones está adquiriendo cada vez más importancia económica en las diferentes especies animales y sobre todo en el sector del vacuno lechero (Pérez García 1991).

En los últimos años se investigaron diversas metodologías de sexaje de embriones que resultaron ineficaces, debido en algunos casos a su dificultad para la puesta en práctica y en otros a su escasa fiabilidad o al largo período de tiempo requerido para llevarlas a cabo (Alcaide 1990). Sin embargo, muy recientemente hemos asistido a la puesta a punto de una técnica de sexaje embrionario lo suficientemente práctica como para poder ser aplicada a nivel de campo.

La técnica a la que nos referimos es la resultante de la aplicación y utilización conjunta de varias prácticas laboratoriales, que posibilitan determinar el sexo de los embriones en estadio de mórula o blastocisto y a unos niveles lo suficientemente fiables y rápidos como para poder realizarla asiduamente a nivel de campo (Matthaei *et al.* 1990).

La metodología de sexaje descrita en este artículo está siendo utilizada comercialmente en algunos países de Europa y los resultados obtenidos de-



Vista general del laboratorio de embriocentesis y sexaje.

muestran una elevada fiabilidad de la misma.

El sistema de sexaje utilizado se basa en la embriocentesis (Herr *et al.*, 1991) y la utilización de la técnica de duplicación del 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 (Jestin *et al.*, 1989).

Las muestras obtenidas se someten 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 ultravioletas de la presencia o ausencia de las bandas correspondientes al cromosoma Y (Herr *et al.*, 1990).

Todo el proceso de manipulación requiere un tiempo aproximado de cuatro a cinco horas; durante este período, los embriones pueden mantenerse en cultivo hasta su posterior transferencia en fresco, o bien pueden transferirse nada más haber finalizado la centesis de los mismos y esperar el resultado del sexaje, impidiendo me-

dante una inyección de prostaglandina F 2 alfa, la gestación de aquellos embriones de sexo no deseado.

MATERIAL Y METODOS

La primera experiencia de sexaje de embriones bovinos fue realizada en nuestra ganadería durante los días 23 y 24 de mayo de 1991 en lo que fueron denominadas las «Primeras Jornadas Técnicas sobre Transferencia y Sexaje de Embriones en Ganado Vacuno» (Alcaide 1991).

La puesta en práctica de la tecnología de sexaje de embriones pudo realizarse gracias a la obtención por parte de los componentes del departamento de MOET de la citada empresa de un total de 16 embriones en estadio de blastocisto procedentes de vacas donadoras de pura raza Holstein.

Los embriones se obtuvieron mediante la perfusión («flushing») del útero de las donadoras que habían sido sometidas a superovulación a partir del décimo primer día del ciclo sexual (Alcaide *et al.*, 1989) utilizando un tra-



Micotil: una inyección, sin más.

EL PRIMER TRATAMIENTO METAFILACTICO CONTRA LA NEUMONIA DEL TERNERO.

Micotil, es un moderno antibiótico desarrollado por Elanco con una actividad genuina, tanto por su espectro de actividad como por su sistema de aplicación contra la neumonía del ganado vacuno. La materia activa de Micotil se ha formulado para alcanzar un alto y rápido nivel terapéutico allí donde es necesario, en los pulmones; permanecer largo tiempo en ellos y atacar la infección durante más de 72 horas seguidas.

Micotil se diferencia de otros productos por su rápida difusión y prolongada permanencia en pulmón. Micotil tiene una excelente actividad frente a los principales organismos causantes de la neumonía bacteriana en ganado vacuno:

La alta potencia, especificidad y prolongada actividad en pulmón de Micotil lo adecuan a la nueva estrategia **Metafiláctica*** que exige:
RÁPIDA REACCIÓN, RÁPIDA RESPUESTA Y PROLONGADA ACTIVIDAD.

1º SE APLICA CON UNA INYECCION SUBCUTANEA.

Ahorra manejo. Menos estrés del animal. Menor daño muscular. Mejor canal. Menos gastos terapéuticos. Más simple manejo de la zona de enfermería.

2º SE REQUIERE UNA DOSIFICACION DE BAJO VOLUMEN.

(1 CC / 30 KG DE PESO VIVO)

Fácil y rápida administración. Un solo punto de inyección. Menos estrés. Menos producto que controlar, almacenar e inyectar.

3º PRODUCE UNA RAPIDA MEJORA DE LOS PARAMETROS CLINICOS EN LAS PRIMERAS 24 HORAS.

Buen control del proceso respiratorio. Rápida recuperación. Menos recaídas. Menos retratamientos. Mayor ganancia de peso.

4º NO NECESITA REFRIGERACION NI MEZCLADO. LISTO PARA USAR EN CUALQUIER MOMENTO.

Disminuye los problemas de almacenamiento. Fácil manipulación, uso y conservación.

Avda. de la Industria, 30.
 28100 Alcobendas. Madrid
 Tfno. 91/623 50 00.

(*) Tratamiento que se aplica a los animales con indicios de enfermedad y antes de que se manifieste la enfermedad.

tamiento superovulatorio de diez inyecciones seriadas y decrecientes de «HMG» (gonadotropina menopáusica humana. Pergovet 500 Sero-no) y una dosis de prostaglandina F2 alfa inyectada el tercer día de tratamiento superovulatorio (Estrumate).

La perfusión uterina se realizó el octavo día después de observado el celo en las donadoras, las cuales habían sido previamente inseminadas artificialmente a las 12 y 24 horas del celo post-superovulatorio.

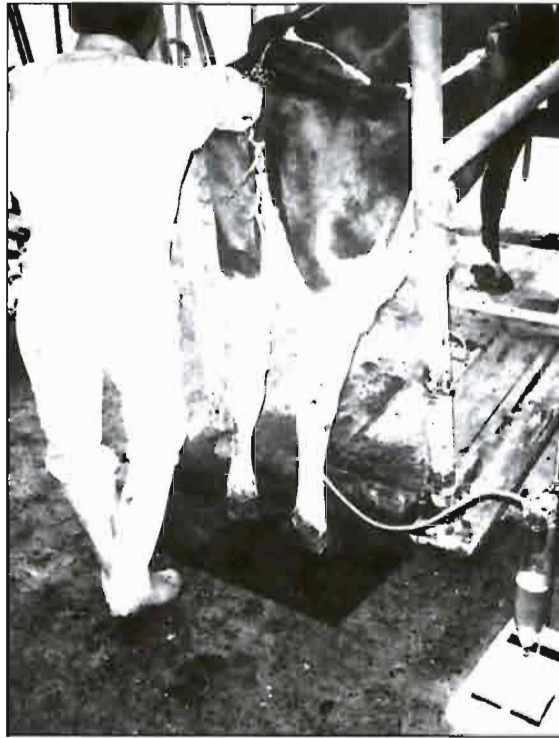
Los embriones, una vez obtenidos, fueron sometidos a diez lavados consecutivos con PBS estéril, siendo posteriormente clasificados y calificados según su morfología con la ayuda de un microscopio de interferencia de fases con óptica «Normasky» (Nikon).

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

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 embriocentesis. El medio de las microgotas contenía PBS 0,25 M de sacarosa libre de Ca y Mg y carente de proteínas. Todas las microgotas se recubrieron con aceite de parafina (Sigma). Este medio tiene la ventaja de provocar la fijación de los embriones al fondo de la placa, evitando, de esta forma, la necesidad de sujeción de los mismos con otro micromanipulador.

La biopsia embrionaria se realizó mediante la utilización de un microscopio invertido (Nikon) dotado de un micromanipulador con un dispositivo de manipulación automático o «joystick» (AB Technology) al cual se le había adaptado una microcuchilla para proceder a la centesis de los correspondientes embriones destinados para el sexaje.

El microcorte se realizó en el borde



Recolección embrionaria mediante perfusión uterina con PBS.

del blastocisto, evitando así dañar el botón embrionario del mismo. Una vez realizada la extracción del polo embrionario, se inyectó una cantidad de 10 microlitros de PBS modificado que contenía 4 g/l de albumina 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 utilización de la correspondiente micropipeta. Posteriormente, 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), hecho que ocurrió una vez detectado el sexo de los mismos.

Una pequeña cantidad de células embrionarias extraídas sirvieron como muestras para el análisis del ADN de las mismas, para lo cual se sometieron a su liberación y desnaturalización mediante choques térmicos a una temperatura de -196 °C y posterior centrifugación a 12.000 rpm, sometiéndolas a una temperatura de 115 °C durante siete minutos.

Liberado el ADN de las muestras embrionarias, se procedió a realizar la «Reacción de Cadena de Polimerización (PCR)» en un volumen de una solución de 10 microlitros que con-

tiene entre otros componentes determinadas cantidades de KCl, HCl, MgCl₂, Tris, 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.

Realizada la determinación del sexo de cada uno de los embriones, se envasaron individualmente en pajuelas francesas (modelo IMV) de 0,25 ml de volumen y se transfirieron vía no quirúrgica a novillas nuligestas que habían sido previamente sincronizadas mediante el uso de inyecciones de prostaglandina F2 alfa y encontrándose 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 16 embriones pudieron ser sexados mediante la metodología explicada, obteniéndose un resultado experimental de 9 embriones de sexo femenino y 7 de sexo masculino.

En esta primera experiencia, los 16 embriones se transfirieron una vez finalizado el sexaje a 16 novillas nuligestas de unos 17 meses de edad mediante el método no quirúrgico; confirmando 10 gestaciones, lo que supuso una fertilidad del 62,5% (ver cuadro I).

De los 9 embriones transferidos de supuesto sexo femenino se obtuvieron 7 gestaciones, obteniéndose 3 gestaciones de los 7 embriones transferidos y de supuesto sexo masculino. Una de

estas gestaciones de sexo masculino no llegó a término debido a un aborto que no fue detectado a tiempo, por lo que no pudo constatar el sexo del feto.

La confirmación del sexo de los animales resultantes se produjo con el parto de las restantes receptoras. Estos partos se presentaron a lo largo de una semana en las instalaciones del área de maternidad, comenzando a producirse el 14 de febrero de 1992 y ocurriendo el último el día 20 del mismo mes de febrero.

De las nueve gestaciones restantes se obtuvieron 8 recién nacidos cuyo sexo coincidió perfectamente con el sexo previsto (6 hembras y dos machos) y otro recién nacido macho de sexo distinto. De las seis hembras, una murió recién nacida. Estos resultados arrojan una fiabilidad de un 88,88% (un fallo de sexo sobre nueve).

DISCUSION

El porcentaje de fertilidad obtenido tras la biopsia, cultivo y posterior transferencia de los embriones sometidos a sexaje fue de un 62,5%. Este porcentaje de fertilidad es indicativo de que la técnica de biopsia embrionaria probablemente no provoca una reducción notable de la fertilidad de los embriones sometidos a la misma, ya que el porcentaje de fertilidad obtenido en esta experiencia se aproxima mucho al observado con embriones de calidad excelente y transferidos a novillas nuligestas en la misma ganadería durante el mismo año.

En nuestra experiencia se transfirieron todos los embriones una vez que se había determinado el sexo de los mismos, lo que se debió a la necesidad de averiguar el grado de fiabilidad en la predicción. Esto no significa que una vez estimada una alta fiabilidad de la técnica se deban transferir todos los



Biopsia embrionaria mediante manipulador automático conectado al microscopio invertido.

embriones, puesto que se podrían eliminar los de sexo no deseado.

La fertilidad podría probablemente verse incrementada si se realizase la transferencia de los embriones en fresco inmediatamente después de haber realizado la biopsia; de este modo se determinaría el sexo del embrión después de haberle transferido, con lo que muy probablemente se obtendrían unos resultados de fertilidad superiores a los que se obtendrían si se esperase a haber finalizado todo el proceso de determinación del sexo (técnica que requiere de cuatro a cinco horas en el mejor de los casos).

Las gestaciones de sexo no deseado se podrían evitar mediante la inyección intramuscular de una dosis de prostaglandina F2 alfa a la receptora que hubiera recibido un embrión de sexo no deseado. Utilizando este esquema de inyección de prostaglandina F2 alfa en los casos de embrión de sexo no deseado, tan solo se perderían unos 11

días de ciclo en la receptora correspondiente, lo que reduciría en gran parte las pérdidas ocasionadas por el retraso en la gestación de la misma.

La fiabilidad de la técnica obtenida del 88,88% en esta primera experiencia (8 positivos sobre 9 predicciones) se aproxima bastante a la apuntada por otros autores que emplean la misma técnica en países de nuestro entorno (Nivot 1992 comunicación personal).

Los errores en la predicción del sexo mediante esta técnica se deben en su mayor parte a contaminaciones de las placas de las muestras embrionarias con células procedentes de animales del sexo opuesto, por lo que se recomienda extremar al má-

ximo las condiciones de limpieza e higiene de todo el material y personal utilizado para realizar el sexaje.

En nuestra experiencia se trabajó en las mejores condiciones de asepsia posibles, pero hay que reseñar que en aquella ocasión no dispusimos de una campana de flujo laminar, lo que muy probablemente puede reducir bastante las posibilidades de contaminación celular de las muestras destinadas al análisis.

La embriocentesis apoyada del sexaje podría ayudar aún más para la instauración de esta técnica a nivel de campo. A este respecto, es necesario comentar que cuando se realiza la 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

Cuadro I
Resultados de la transferencia de embriones sexados en Tauste Ganadera

	N.º de embriones transferidos	N.º de gestaciones diagnosticadas	Porcentaje de fertilidad	N.º partos obtenidos	N.º machos obtenidos	N.º hembras obtenidas
N.º embriones totales	16	10	62,5	9	3	6
N.º embriones de sexo macho	7	3	42,8	2	3	—
N.º embriones de sexo hembra	9	7	77,7	7	—	6

Nota: Una gestación de embrión supuestamente macho no llegó a término. Un embrión supuestamente hembra se tradujo en el nacimiento de un macho.



Embriones en diferentes estadios.

número de gestaciones del sexo deseado.

La técnica de fijación del embrión al fondo de la placa de «Petri» utilizando un medio específico permite realizar prácticas laboratoriales tales como la embriocentesis, biopsia embrionaria, etc., mediante un micromanipulador de un solo brazo, lo que abarata enormemente el instrumental necesario para realizar todos estos trabajos.

La Sociedad Internacional de Embriones, con el fin de impedir la difusión de enfermedades, prohíbe la congelación de embriones cuya zona pelúcida no se presente intacta, lo que anula por ahora la posibilidad de comercializar embriones sexados mediante la técnica comentada.

En estudios futuros se debería ahondar en la búsqueda de una técnica de congelación de embriones sexados que permita por una parte conservar la viabilidad indefinida de los mismos y por otra impedir la transmisión de cualquier agente patógeno. Esto permitiría que la Sociedad Internacional aceptase la congelación de embriones cuya zona pelúcida no estuviese intacta e indirectamente la venta de embriones sexados congelados.

La técnica del sexaje embrionario puede producir un elevado beneficio económico en el sector del ganado vacuno lechero, ya que tan solo se obtendrían gestaciones del sexo deseado (normalmente el femenino), con lo que el número de partos necesarios para obtener el mismo número de

hembras se reduciría en más de un 50%, además se evitarían los partos gemelares de macho y hembra.

CONCLUSIONES

Las primeras experiencias apuntan a la obtención de un nivel elevado de fiabilidad en la predicción del sexo utilizando esta técnica de amplificación del ADN.

Es necesario depurar la técnica sobre todo evitando posibles contaminaciones celulares para de esta forma reducir en la medida de lo posible los fallos de diagnóstico del sexo.

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

Los porcentajes 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.

Se recomienda transferir los embriones sometidos a biopsia inclusive antes de haber determinado su sexo, para unas horas más tarde inyectar una dosis de prostaglandina F2 alfa a aquellas receptoras que hubieran recibido un embrión del sexo no deseado.

Deben realizarse esfuerzos para apoyar la técnica del sexaje embrionario junto con otras técnicas asociadas, tales como la embriocentesis, clonación y microinyección, lo que podría tradu-

cirse en una rápida mejora en los diferentes sectores ganaderos.

Agradecimientos

El autor y los componentes del departamento de MOET de Tauste Ganadera S.A. desean agradecer la colaboración de la Diputación General de Aragón, del CENS-YRA de Movera, la de los técnicos de France Embryon gracias a los cuales fue posible realizar esta experiencia de sexaje de embriones bovinos y la estimable ayuda del profesor Tomás Pérez García, catedrático de Biología de la Facultad de Veterinaria de Madrid.

BIBLIOGRAFIA

- ALCAIDE, G. M. 1991. Primer sexaje de embriones bovinos en España: *Mundo Ganadero* 1991-10: 63-65.
- ALCAIDE, G. M.; CRUANES, O. J.; CHAMUL, F.; CRUZ, N. 1990. Transferencia embrionaria bovina a nivel de campo: Metodologías de descongelación y tratamiento de embriones congelados para su transferencia. 5.ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Zaragoza, 14-17 junio de 1990. Actas: 145-151.
- ALCAIDE, G. M. 1989. Transferencia embrionaria: Realidad, Presente y Futuro. *Mundo Ganadero* 1990-3: 35-39.
- ALCAIDE, G. M.; APARICIO, F.; CHAMUL, F.; CRUZ, N. 1989. Congelación/descongelación de embriones bovinos: Adición y retirada gradual del agente crioprotector. 4.ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. León, julio de 1989. Comunicaciones Libres: 239-246.
- BONDIOLI, K. R.; ELLIS, S. B.; PRYOR, J. H.; WILLIAMS, M. W. and HARPOLD, M. M. 1989. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 31: 95-104.
- HERR, C. M. and REED, K. C. 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 35-1: 45-54. 1991.
- HERR, C. M.; MATTHAEI, K. I.; STEEL, T. and REED, K. C. Rapid Y-chromosome assay of peripheral blood lymphocytes from bovine of a known phenotypic sex. *Theriogenology* 33: 246 Abstr. (1990).
- JESTIN, A.; FOULON, T.; BLANCHARD, P. 1989. 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. Octubre-novembre.
- MATTHAEI, K. I.; HERR, C. M.; BRADLEY, M. P. and REED, K. C. 1990. Analysis of sex chromosome constitution of single bovine spermatozoa by polymerase chain reaction (PCR). *Theriogenology* 33: 285 Abstr. (1990).
- PÉREZ GARCÍA, T. 1991. Transcendencia económica de la aplicación de los modernos conocimientos sobre reproducción a la producción animal: *Información Veterinaria*, 115: 29-32.



MYCOMICINA

JOSAMICINA - COLISTINA

y

MYCOTRIM

JOSAMICINA - TRIMETOPRIM

強效黴素



UNA NUEVA
GENERACION
EN LA
TERAPIA
CONTRA LOS
MYCOPLASMAS



SYVA
Laboratorios