



equisan.com

la clínica equina en la web

A lo largo de los últimos años asistimos a un rápido desarrollo de las técnicas de reproducción, las cuales alcanzan mayor repercusión en el campo a medida que se logran avances que hacen su uso más fácil, mejoran los resultados y se abaratan los costes de su aplicación.

Como afirma BETTERIDGE (periodista británico especializado en nuevas tecnologías) “puede afirmarse que el deseo del hombre de controlar el sexo de sus animales es tan viejo como la domesticación de éstos”. Existe un pintoresco cúmulo de creencias vulgares al respecto que se remontan a tiempos pretéritos y todavía prosiguen en la actualidad. En el año 456 antes de JC, se creía que las hembras procedían del testículo izquierdo y los machos del derecho. Plinio apuntó en el año 50 de nuestra Era que los toros desmontaban hacia la derecha después de engendrar un macho, y hacia la izquierda después de engendrar una hembra. Otra creencia afirmaba que el sexo venía determinado por la dirección del viento en el momento de la cópula. No obstante hoy en día se sabe que el sexo genético de los mamíferos, en los cuales existe heterogametia del sexo masculino, se determina en el momento de la singamia, dependiendo de que el óvulo portador del cromosoma X sea fecundado por un espermatozoide X o Y.

En la actualidad se reconocen diferentes biotecnologías aplicadas a equinos para mejorar las condiciones reproductivas, y hacer este aspecto, más eficiente. En ese orden de ideas, se puede apreciar que actualmente están en pleno desarrollo técnicas que permiten entre otras cosas, desarrollar Inseminaciones artificiales, diagnosticar gestaciones en forma temprana, sexar espermatozoides para obtener sexos específicos, sexar embriones para tener mercados en los cuales se puedan elegir crías con características genotípicas particulares.

En el mundo equino, la posibilidad de sexar semen ha supuesto un avance, puesto que en ciertas disciplinas como es el Polo, las yegudas necesitan producir una mayor cantidad de hembras que de machos porque las hembras son las que transmiten la aptitud para esta

disciplina. Además resulta interesante en el tema del equilibrio de sexos dentro de un yeguada, normalmente se suele buscar que el número de machos y de hembras sea similar para estar compensados.

Cabe destacar que en el caso de los equinos de Pura Raza Inglés, el uso de biotecnologías, particularmente la inseminación artificial y la transferencia de embriones se encuentran prohibidas, es más, las asociaciones de la raza exigen que todas las crías deben ser obtenidas por medio de monta natural.

La demanda para las técnicas de sexaje de embriones equinos en la actualidad es demasiado baja pero, no obstante, si el congelamiento de embriones equinos incrementara en los próximos años, es indudable que la demanda de sexaje de éstos antes de ser congelados también aumentará.

En 1998 nació la primera potranca procedente de semen sexado y en 2003 la primera cría nacida de padre y madre nacidos de semen sexado.

1. Sexaje de semen

Entre las principales ventajas que se pueden derivar de la aplicación práctica de esta tecnología se destacan:

- ✓ La capacidad de programar la producción hacia un sexo determinado, dependiendo de las demandas del mercado, la cual es de suma transcendencia económica para las explotaciones de multiplicación
- ✓ La capacidad de las empresas de selección para desviar sus producciones a líneas macho o hembras según la programación comercial de sus actividades, repercutiendo, de forma sustancial, en los índices económicos de dichas empresas.
- ✓ La posibilidad de acelerar y mejorar los programas de mejora genética.

Los métodos modernos para sexaje de espermatozoides pueden clasificarse en dos grupos, a saber:

- ✓ Aquellos que intentan separar espermatozoides sobre la base de sus características físicas o cinéticas
 - fraccionamiento sobre columnas de albúmina,
 - filtración con sephadex,
 - separación electroforética
 - Antígeno H-Y
- ✓ Aquellos que actúan sobre las diferencias nucleares de los espermatozoides que transportan el cromosoma "X" o el "Y".

La tecnología del sexado de semen ha sido aplicada con éxito en el equino y ofrece la posibilidad de elegir el sexo de la progenie con una certeza >90%. (Lindsey, 2001)

Sin duda, la técnica más empleada para el sexado de espermatozoides es la tinción fluorescente de ADN con posterior separación por citometría de flujo en espermatozoides "X" e "Y", la cual se explica a continuación:

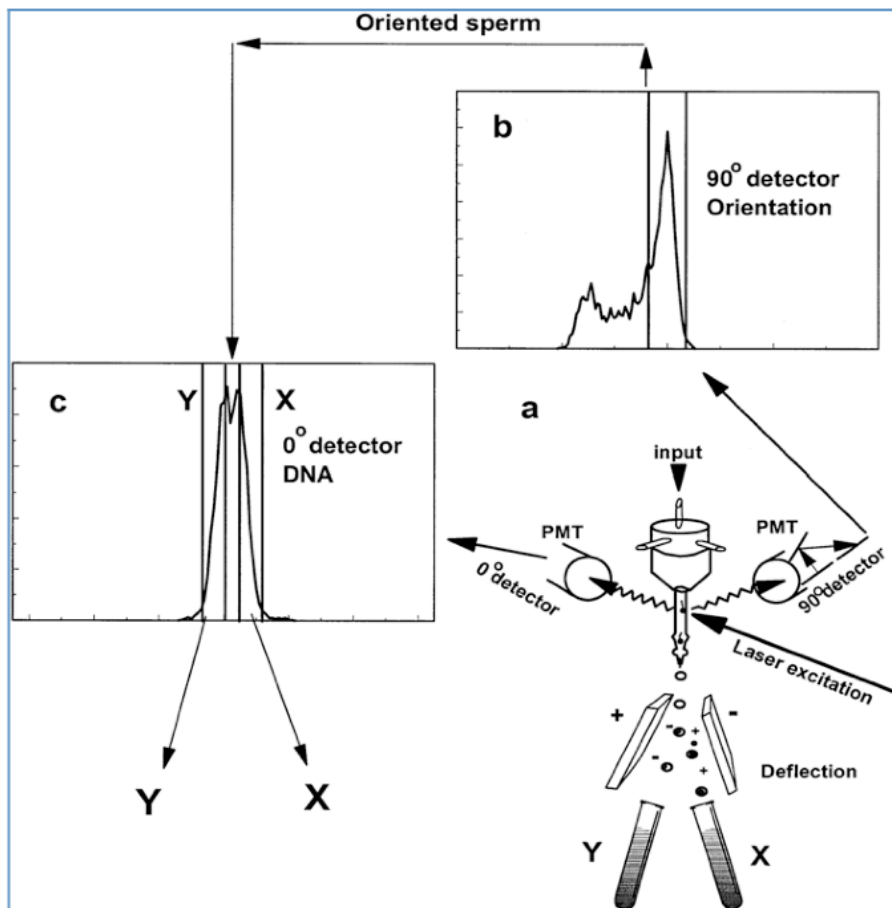
Estudios recientes demuestran que la velocidad de los espermatozoides "X" e "Y" son diferentes. Esto se debe a la diferencia de peso que presentan, 3.7% mayor contenido de DNA para el "X" y son mas grandes que los espermatozoides Y (este contenido adicional a favor de los espermatozoides "X" es lo que hace que se tiñan más y que su movimiento sea mas lento que el de los "Y").

- i. La técnica de **citometría de flujo** consiste en separar los espermatozoides según la fluorescencia que emiten las diferentes longitudes de onda, que pueden ser detectadas por medio de un citómetro, previa marcación de las células con fluoro-cromo; dentro del citómetro son impulsadas para que pasen a través de un rayo láser; al hacer contacto con éste, el espermatozoide emite una luz fluorescente con una longitud de onda que es específica del contenido de ADN de la célula y, dependiendo de la emisión, son depositadas en un recipiente que al final del proceso tiene fracciones enriquecidas de uno u otro espermatozoide ("X" o "Y") . A mayor cantidad de ADN (espermatozoides con cromosoma "X"), mayor fluorescencia ó luminosidad.

El sistema informático que controla este proceso, en realidad, clasifica los espermatozoides en tres grupos: los que portan el cromosoma "X", los que portan el cromosoma "Y", y una población mixta de portadores de los dos tipos de cromosomas, que no han podido ser clasificados con claridad. Después, mediante un vibrador los distintos grupos se fraccionan en micro- gotitas (a razón de 70/80 mil por segundo) portadoras de un espermatozoide en cada una, que pasan por un dispositivo que les asigna una carga eléctrica positiva ó negativa, según la clasificación hecha por el sistema; finalmente, se las hace pasar por un campo magnético donde aquellas con carga positiva (cromosomas X) son atraídas hacia el lado negativo, y viceversa. Así se forman tres corrientes de gotas, que se pueden coleccionar en

tres tubos
de ensayo diferentes para separar los espermatozoides X e Y.

Esquema que ilustra el proceso de citometría de flujo para el sexado de semen:



FUENTE: JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science* 60–61_2000.93–107.

- ii. Existe otra técnica de **selección del sexo por enzimas ligadas al cromosoma "X"**. Se basa en las diferencias entre los cromosomas "X" e "Y" y la determinación de algunos segmentos genéticos presentes sólo en uno de los dos, el "X", el cual tienen genes que codifican para la producción de enzimas como glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), hipoxantina fosforil transferasa (HPRT) y galactosidasa. Así pues, la evaluación de la actividad enzimática posibilita la determinación del sexo.

Este método está restringido a un periodo comprendido desde la activación del genoma embrionario hasta el momento en que los dos cromosomas "X" aún permanecen activos. En bovino

correspondería desde el estadio de 8 a 16 células hasta aproximadamente, al estadio de blastocisto.

iii. Separación de espermatozoides por anticuerpos monoclonales

Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos monoclonales de unirse a marcadores específicos en la superficie de los espermatozoides X e Y. Los espermatozoides Y son capturados por los anticuerpos y fijados en la pared de la cubeta. Este proceso dura entre 20-30 minutos.

El semen remanente, con sólo espermatozoides X, es retirado y utilizado para inseminar

Ventajas

Puede ser realizado por el productor

Sólo toma 20-30 min.

No produce cambios genéticos

Desventajas

Se pierde la mitad de los espermatozoides

Todavía no hay kits en el mercado

1. Sexaje de embriones

Hay 2 maneras de sexar los embriones:

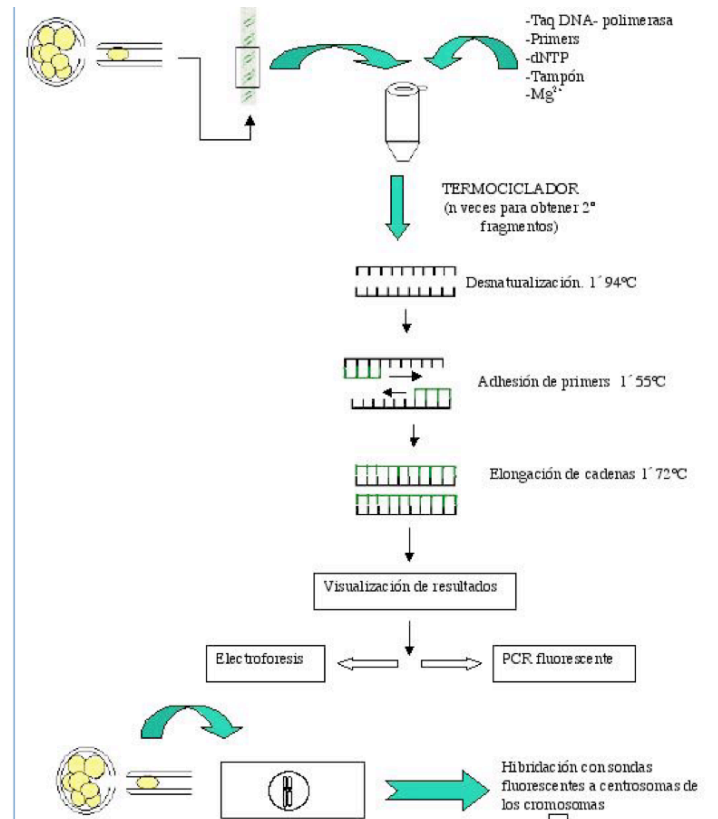
- ✓ Método preconcepcional: basada en el sexaje de espermatozoides como anteriormente explicado
- ✓ Diagnóstico genético preimplantacional: es el diagnóstico que realizamos sobre los embriones una vez ocurrida la fertilización.

1. Diagnóstico genético preimplantacional:

Se han descrito diferentes metodologías para la separación de los embriones machos de las hembras. Uno de los ensayos es a través de procesos inmunológicos, en el cual se utilizan anticuerpos diseñados que son específicos contra moléculas que se encuentran en la superficie del embrión macho (detección del antígeno H-Y). También se puede determinar el sexo de los embriones analizando cariotipos de biopsias realizadas en los embriones, en los cuales se observa la presencia o no del cromosoma Y. Pero el avance de tecnologías de biología molecular en estos últimos años ha permitido la incorporación de tecnologías con hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcadora que identifica en una célula del embrión la presencia o no del cromosoma Y.

La técnica en sí necesita la realización de una biopsia embrionaria. Primeramente realizaremos la punción ovárica transvaginal para la extracción del ovocito e inseminación de éste *in Vitro*. Los cigotos se cultivan en el laboratorio hasta que se consiguen embriones de 6-8 células. En este estadio se realiza la biopsia embrionaria de 1 o 2

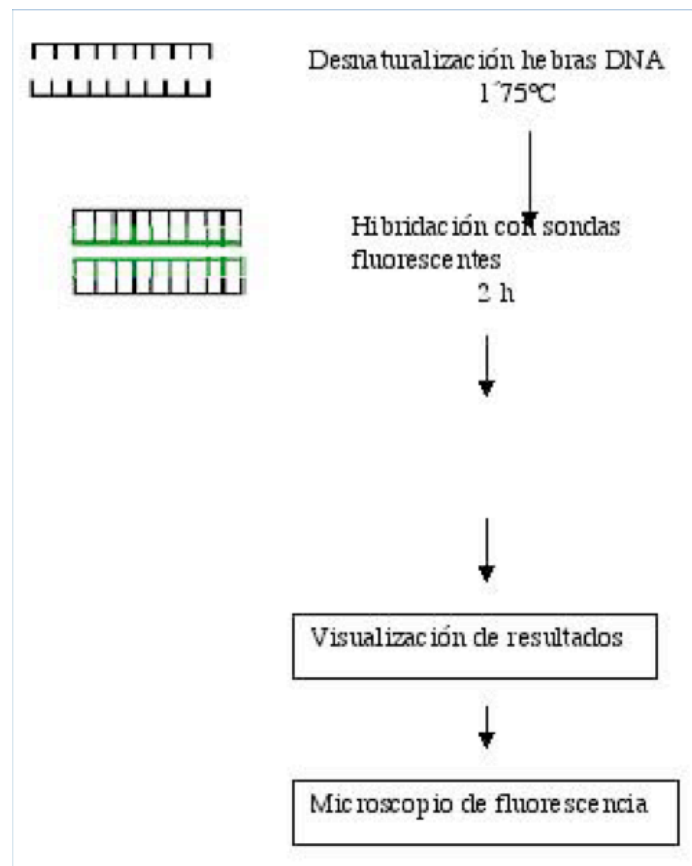
blastómeros, se desnatura el material obtenido y se lleva a cabo el análisis de la dotación de cromosomas sexuales de las células biopsiadas y los embriones biopsiados se mantienen en cultivo en el laboratorio.



A nivel específico, existen 3 formas de determinar el sexo de los embriones, aunque cada una de ellas inicia con la biopsia embrionaria anteriormente mencionada.

- ✓ **Citogenética clásica:** visualización directa de los cromosomas del embrión (cariotipo). Esta técnica tiene baja eficiencia por lo que actualmente no tiene aplicación clínica.
- ✓ **PCR:** Detección de presencia o ausencia del cromosoma "Y" mediante la amplificación de una secuencia específica de este cromosoma. El amplificado se realiza en un termociclador mediante ciclos de desnaturalización del DNA, adhesión de primers específicos de la secuencia a amplificar y síntesis y elongación de cadenas mediante la polimerasa. Los resultados de la amplificación se visualizan por PCR fluorescente o electroforesis (la velocidad de migración del ADN por el gel de agarosa es inversamente proporcional a su tamaño/masa molecular) y se seleccionarían los embriones deseados según los resultados obtenidos. Es una técnica muy precisa y sensible.

- ✓ **FISH (Fluorescence In Situ Hybridization):** visualización de los cromosomas celulares del blastómero por fluorescencia. Se lleva a cabo una desnaturalización del centrosoma de los cromosomas y posteriormente una hibridación con sondas específicas de cada tipo de cromosoma unidas a fluorocromos que se ponen de manifiesto al ser excitados en un microscopio de fluorescencia.



Conclusiones

- ✓ La eficiencia reproductiva de los equinos se ha beneficiado en los últimos años por la aplicación de biotecnologías como la inseminación artificial y la transferencia de embriones, por lo que el sexaje de semen o de los embriones, todavía no muy consolidado en la especie equina, cobra una mayor importancia a la hora de comercializar con éstos, pues permite la selección del sexo del feto en función de las necesidades del comprador.
- ✓ Un buen ejemplo de esto son los caballos de Polo, donde la transferencia de embriones se encuentra casi a la orden del día, pues las yeguas de alta performance después de terminar la temporada de competición pasan como donadoras a centros de transferencia de embriones. El avance del sexaje de semen para

esta clase de caballos es muy importante pues las yeguas son las que transmiten la aptitud para esta disciplina

- ✓ Hasta el momento solamente algunas razas de caballos deportivos están aprovechando las ventajas de ésta biotecnología.
- ✓ La técnica más usada en equinos para el sexaje de semen es la tinción con fluorescente de los espermatozoides y posterior separación por citometría de flujo mientras que en sexaje de embriones , a pesar de su poco uso en equinos, es la biopsia embrionaria y procesamiento mediante PCR.

***Autora: Eva Moreno Iglesias
EQUISAN Veterinaria Equina Integral***

Bibliografía

- P. Brinsko, S, L. Blanchard, T, D. Varner, D, Schumacher J, C, Love C, Hinricks K, Hartman D. Manual of equine reproduction: Embryo Transfer. Chapter 17. Maryland Heights, Missouri: Elsevier; 2011.
- <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/6011/1/T14.08%20D543d.pdf>
- <http://wb.ucc.edu.co/sdmvz/files/2013/06/articulo-3-vol-1-n-2.pdf>
- <http://www.acnv.es/centenario/libro/zootecnia/perez.pdf>
- http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/129-sexado.pdf
- <http://www.fisicabiologica.com.ar/curso-criopreservacion-de-gametas-2009/ppt/L%20-%20Sexado%20de%20Semen%20Aplicacion%20en%20ganado%20echeo%20y%20porcino.pdf>
- <http://www.vet-uy.com/articulos/equinos/050/0033/eq033.htm>

