

Biotecnologías reproductivas: producción in vitro de embriones y semen sexado. (¿La pareja perfecta?)

Luis Ferré¹ y Luciano Cattaneo²¹ INTA Rafaela, Ruta Nacional 34, Km 227, Rafaela (2300), Santa Fe.² Fac. Cs. Veterinarias, UNL, RP Kreder 2805, Esperanza (S3080HOF), Santa Fe.

*Correo electrónico: ferre.luis@inta.gob.ar; luisbferre@gmail.com

(Recibido: 6 de noviembre de 2012; Aceptado: 24 de julio de 2013)

No existen conflictos de interés.

Palabras clave: Embrión, in vitro, semen sexado, fertilización, bovino.

Keywords: Embryo, in vitro, sexed semen, fertilization, bovine.

RESUMEN

La producción in vitro de embriones (PIVE) y el semen sexado (SS) en el bovino han logrado un importante avance en los últimos años como resultado de un mayor entendimiento de estas herramientas por parte de los usuarios y del potencial de dichas técnicas. La combinación de PIVE y SS está siendo ampliamente utilizada en los Estados Unidos, Europa y Brasil. Las principales ventajas son mayor producción de embriones y preñeces por unidad de tiempo, más categorías para recuperar ovocitos, número reducido de espermatozoides para fertilizar y un aumento en la probabilidad de obtener el sexo deseado. Existen también algunos cuestionamientos sobre la reducción en fertilidad del SS en comparación con su par convencional y otros elementos asociados a la PIVE, tales como competencia y calidad del ovocito, congelabilidad del embrión y capacidad para generar preñeces. No obstante, es prometedora la investigación que se realiza en el tema para solucionar estas deficiencias. La combinación PIVE y SS ha resultado exitosa a nivel comercial en varios países, al asistir al profesional y al productor ganadero para superar sus índices reproductivos y para el mejoramiento del rodeo.

SUMMARY

Reproductive biotechnology: In vitro embryo production and sexed semen (The perfect couple?).

The use of sexed semen (SS) during in vitro production (IVP) of embryos made a significant progress in recent years due to a better understanding of the full potential of this system, by farmers and practitioners. The combination of IVP and SS is widely used in the United States, Brazil and throughout Europe. Distinct advantages of this system are an increase in the number of embryos and pregnancies per production period, a greater variety of females from which to retrieve oocytes, a reduction in the sperm number required for fertilization and finally, an increased chance of obtaining the desired sex. However, there are some unresolved aspects regarding the reduction in fertility with SS as compared to conventional semen. Some elements associated with this discrepancy are, oocyte quality and competence, embryo viability after cryopreservation and the ability to generate pregnancies as in vivo counterparts. Nevertheless, promising research is being published or undertaken to address these deficiencies. Use of SS in conjunction with IVP is commercially successful in several countries, allowing practitioners and cattle producers to improve overall reproductive performance, efficiency and genetic gain.

Introducción

Desde los años 70, tanto en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados, el consumo de alimentos ha ido incrementándose exponencialmente como consecuencia del aumento poblacional en el mundo. Esta alta demanda sostenida no solo exige cantidad, sino también calidad. La fuerte tendencia hacia el consumo de alimentos de calidad ha llevado a aumentar rápidamente la población

bovina mundial de leche y de carne. Ante este contexto, las asociaciones de criadores y productores ganaderos recurrieron a las herramientas disponibles para identificar los mejores reproductores mediante programas de selección y mejora genética. Una vez reconocidos los animales "superiores", se inició su proceso de multiplicación.

El acontecimiento que abrió las puertas hacia el desarrollo de nuevas biotecnologías reproductivas y su aplicación comercial fue la

criopreservación exitosa del semen, a mediados del siglo pasado⁴⁷. La IA (inseminación artificial) se realizaba a través de la dilución del semen y de la inseminación en fresco. Una década más tarde se publicaron las primeras experiencias exitosas con semen congelado en glicerol, lo que facilitó el uso masivo de toros seleccionados y el comercio internacional de germoplasma⁴⁷. En los años sucesivos, el progreso estuvo en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero, ciclo estral,

ondas foliculares y la endocrinología reproductiva^{7,33}. Como consecuencia del entendimiento de los tejidos y de los órganos reproductivos y sus funciones, se comenzó a tratar de controlar el ciclo estral y la ocurrencia de celo para lograr una inseminación más concentrada y eficiente^{7, 73}. Así surgen luego el Ovsynch y la inseminación a tiempo fijo (IATF), a mediados de los 90⁴⁸.

De manera contemporánea al desarrollo de la IA y gracias a los conocimientos adquiridos principalmente en el área de control de la dinámica folicular, dominancia folicular y efectos de la hormona foliculoestimulante (FSH) a nivel ovárico, se iniciaron las primeras pruebas de superestimulación folicular y colecta de embriones. El primer ternero producto de la transferencia o trasplante de un embrión (TE) fue obtenido en 1951⁷⁰. La tecnología alcanzó su apogeo en los años 70, cuando la industria ganadera comenzó a importar genética en forma de embriones de razas británicas en lugar de ganado en pie. Las principales ventajas que observaron los usuarios de la época era la disminución del costo, al evitarse largas cuarentenas, y mayores seguridades sanitarias.

Avanzando en este sentido, hacia fines de los 80 aparecieron los primeros reportes de la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía⁴⁶ (OPU) y producción in vitro de embriones⁶⁶ (PIVE). En Europa comenzaron a trabajar en esta herramienta, imitando los adelantos que venían realizándose en la fertilización in vitro humana y, al mismo tiempo, brindando una respuesta a la necesidad de multiplicar hembras elite de manera rápida y sin superestimulación (prohibida en Europa). Los principales centros de inseminación artificial europeos eligieron la OPU-PIVE como el método de elección principal para reproducir su ganado de alto mérito genético. En los EE.UU. recién comenzó a conocerse la técnica a nivel comercial hacia fines de los 90. Para ese entonces, era utilizada principalmente para producir embriones de hembras "problema" que por algún motivo no generaban embriones viables por la técnica de superestimulación, colecta y TE convencional. Por esta razón, el desarrollo comercial de esta tecnología fue muy lento y recién logró su auge con la aparición del semen sexado (SS)^{30,67}.

A mediados de 2000, el SS ya era producido en todos los centros de inseminación artificial de los EE.UU.

y en los principales de Europa. El uso correcto del SS, de acuerdo con las recomendaciones de los centros productores, permitió su rápida expansión e incorporación por parte del productor lechero americano^{31,56,57}. En carne, la penetración fue más lenta y aún continúa siendo baja. Hoy, el SS es utilizado en programas de IA, TE y PIVE, y logra una eficiencia biológica de entre 70-90% en comparación con el semen convencional. Si bien este resultado podría parecer insuficiente, la obtención de una mayor cantidad de animales del sexo de preferencia justifica ampliamente su utilización. En Latinoamérica y en Sudamérica en particular, el SS presentó una baja penetración en el mercado. La aplicación más frecuente es en IA, pero su uso en PIVE está creciendo traccionado principalmente por Brasil. La combinación IA, TE y PIVE con SS logró asociaciones muy poderosas, aunque los resultados alcanzados no siempre han sido muy consistentes en cada caso⁴⁹. Existe extensa bibliografía que ilustra los resultados alcanzados con SS, principalmente en IA^{14,15}.

Producción in vitro de embriones (PIVE)

En la última década se lograron avances significativos en el establecimiento de un procedimiento eficiente de producción masiva de embriones bovinos, incluso sexados. Este desarrollo permitió no solo obtener ventajas económicas directas, sino que, además, sus procedimientos básicos, como la maduración ovocitaria, la capacitación espermiática, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano, contribuyeron al desarrollo de otras biotecnologías, como el clonado y la transgénesis animal.

Es posible obtener embriones in vitro de: vacas y vaquillonas cíclicas y prolíferas, hembras que no responden bien a los tratamientos superestimuladores o que no producen embriones viables transferibles, hembras con alguna anomalía en el tracto reproductivo, falla en el transporte o en la capacitación de las gametas o la ovulación, hembras terminales (edad, enfermedad, accidente), vacas y vaquillonas preñadas durante el primer trimestre de gestación, vacas en posparto (lactación), vacas de alto mérito genético que van al matadero al haber cumplido su ciclo productivo, terneras jóvenes (prepuberres), entre lo más destacado^{5,16,19,21,23,39}.

Es importante tener presente que un

embrión producido in vivo es el resultado final de una serie de complejos eventos altamente relacionados, integrados y bajo el control de mecanismos perfeccionados por miles de años de evolución. La manipulación artificial de estos procesos sobrepasa muchas veces este fino control, de manera que los procedimientos utilizados son solo simulaciones de los eventos naturales. Es preciso remarcar que el desarrollo de esta técnica es reciente, y para ello basta con señalar que los primeros terneros obtenidos por la producción totalmente in vitro ocurrió hacia fines de los 80²². En los últimos años, el progreso en el campo de la biotecnología reproductiva ha sido significativo debido principalmente al mayor entendimiento alcanzado en cuanto a los requerimientos y al metabolismo de las gametas y de los embriones. Esto trajo aparejada la posibilidad de formular medios de cultivo que atendieran esas necesidades y, de esta forma, lograr producir más y mejores embriones^{2,24,28}. Se vienen realizando importantes avances en el sistema de PIVE bovinos, los cuales buscan mejorar la performance global y el rendimiento de las distintas etapas del proceso a través de múltiples estrategias. Entérminos generales, estas etapas son:

- Obtención de los ovocitos
- Maduración de los ovocitos
- Fertilización
- Desarrollo embrionario

Obtención de los ovocitos

Los ovocitos destinados a PIVE pueden ser obtenidos de: 1) ovarios de animales vivos mediante la aspiración folicular o castración (ovariectomizadas), o 2) post mortem (matadero principalmente). En ambas alternativas, los ovocitos son obtenidos a partir de folículos no mayores de 8 mm para evitar incorporar material de folículos que han iniciado el proceso de atresia. En el caso de la aspiración folicular, los folículos son aspirados por medio de la visualización del ovario por ultrasonografía⁴⁶.

Esta modalidad es muy similar a la desarrollada en el humano para los programas de fertilización asistida. Por medio de esta técnica, es posible obtener alrededor de 4-5 ovocitos/sesión/donante sin estimulación ovárica²⁵, mientras que con la adición de FSH pueden lograrse tasas de recupero de ovocitos superiores a

15/sesión/donante. Una donante puede ser sometida a aspiraciones foliculares con una frecuencia de una a dos veces por semana; también es posible colectar hembras gestantes, al menos durante el primer trimestre de la gestación, y terneras prepúberes (>5 meses), aunque estas deben recibir previamente un tratamiento hormonal^{10,11,39}.

La aspiración folicular de donantes vivas por intermedio de un ecógrafo es una técnica no quirúrgica por la cual pueden obtenerse ovocitos en un breve período de tiempo. La técnica consiste en inmovilizar al animal y colocar el transductor del equipo en la vagina de la hembra, el cual lleva incorporada una aguja. Con esta aguja pueden aspirarse los folículos del ovario sostenido por vía rectal. Mediante un sistema de vacío es posible recuperar el líquido folicular junto con el ovocito. Este material es rápidamente filtrado para iniciar la búsqueda bajo estereomicroscopio.

Con respecto a los ovarios de hembras castradas y los obtenidos en el matadero, han sido la fuente de material más ampliamente utilizada desde los comienzos de los trabajos con esta técnica y que, por la disponibilidad de gran cantidad de ovarios, permitió rápidos avances en su desarrollo. Con los ovarios provenientes de hembras castradas es posible proceder de diversas maneras; la más común es la aspiración de los folículos con jeringa o con sistemas de vacío. Las otras técnicas son la disección de los folículos y el corte de la superficie ovárica. En cuanto a cantidad de ovocitos competentes para ser puestos en cultivo, en orden decreciente, se encuentran el corte ovárico, la disección folicular y la aspiración folicular (en promedio de varios autores^{9,43,62,65}, respectivamente 20, 15 y 10 ovocitos, por ovario). Sin embargo, las técnicas de corte ovárico y disección folicular consumen entre tres y cuatro veces más tiempo que la de aspiración folicular por bomba de vacío, por lo que esta metodología es la más utilizada por los laboratorios. Los ovocitos recuperados son evaluados morfológicamente, clasificados y cultivados para proseguir con su maduración.

Maduración de los ovocitos

La maduración ovocitaria o "maduración meiótica" se define como el período en que el ovocito reanuda la meiosis (interrumpida en estado dictioteno de la profase I) hasta el estadio de metafase II. En este estado, los ovocitos adquieren la competencia para ser sometidos a una fertilización

normal y seguir un adecuado desarrollo embrionario^{6,34}.

Los ovocitos provenientes de folículos antrales acompañados por las células del cúmulus (COC) pueden madurar in vitro, después de 22 horas aproximadamente, en un medio de maduración y ambientes óptimos. Alrededor del 90% de los ovocitos inmaduros alcanza su maduración cuando las condiciones de cultivo fueron las apropiadas.

Fertilización

Alrededor de 20-24 h después de colocar los ovocitos en el medio de maduración, se procede a cocultivar los ovocitos ya maduros con los espermatozoides. Estos provienen en general de eyaculados que han sido sometidos al proceso de congelación, por lo que la primera etapa en la preparación de los espermatozoides consiste en su separación de los componentes del medio de congelación y la eliminación de la mayor parte de los espermatozoides muertos. Para ello existen metodologías de laboratorio bien definidas que permiten que una dosis de semen (pajuela) comercial sea suficiente para inseminar más de mil ovocitos.

Los espermatozoides también deben ser tratados con factores capacitantes para que adquieran la habilidad de fecundar a los ovocitos maduros⁴⁵.

La interacción espermatozoide-ovocito en la placa de fertilización sucede en un microambiente muy pequeño (<50 µl para donantes aspiradas y <200 µl para ovocitos de matadero). El número mínimo necesario de espermatozoides por ovocito no está definido debido a su gran variación entre toros y razas. Generalmente, se utiliza la relación 1 millón de espermatozoides por mililitro de medio de fertilización.

Otra manera de expresar esta interacción es el número de espermatozoides por ovocito. La relación más común es 4.000 a 8.000 espermatozoides por ovocito²⁰. En el caso de SS, usualmente una pajuela rinde 100-120 ovocitos.

La tasa de fertilización, medida como la tasa de clivaje a las 48 h posinseminación, oscila habitualmente entre el 70 y el 85% de los ovocitos expuestos a los espermatozoides.

Desarrollo embrionario

Cumplido el período de fertilización (16 horas en adelante), los ovocitos fertilizados son acondicionados para ser cultivados por un período de siete días hasta alcanzar el estadio de blastocisto (instancia en la que pueden ser transferidos o

congelados). Entre el 20 y el 40% de los ovocitos cultivados llegará al estadio de blastocisto^{37,50,51,63}. Esta merma o bajo desarrollo embrionario tomando como referencia el alto porcentaje de ovocitos que alcanzan la maduración meiótica o nuclear no estaría acompañada por una completa maduración citoplasmática⁵⁸ Como consecuencia, la competencia o capacidad del ovocito en fusionarse con un espermatozoide, formar pronúcleos, iniciar la división celular, compactación y blastulación podría verse comprometida (**Figura 1**).

Llegados a este grado de desarrollo, los embriones pueden ser transferidos o congelados. La transferencia se realiza siguiendo exactamente los mismos pasos y procedimientos que para los embriones producidos in vivo. La congelación de embriones PIVE es recomendada solo para embriones de alta calidad. La metodología de congelación más utilizada en la actualidad para embriones PIVE es la vitrificación, aunque el congelamiento lento (*slow freezing*) está ganando adhesiones nuevamente^{8,35,64}.

Fortalezas y debilidades de PIVE

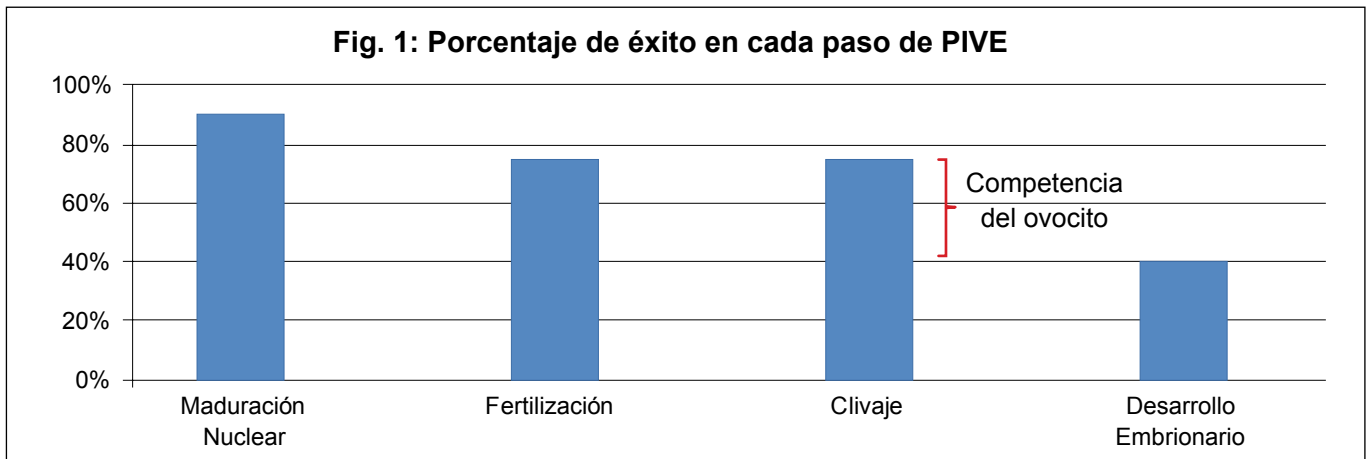
La aplicación de la técnica PIVE está creciendo por varias razones. Entre las más destacadas podemos mencionar las siguientes:

- Mayor producción de embriones por unidad de tiempo al poder realizar aspiraciones foliculares frecuentes.
- Producción de embriones de hembras en diversas condiciones fisiológicas.
- Mayor progreso genético al facilitar la utilización de toros de alto mérito genético.
- Modificación de la relación 50% machos:50% hembras, mediante SS.
- Asegura la reposición de hembras.
- Facilita la erradicación de enfermedades del establecimiento.

Si bien la técnica goza de cierta popularidad entre los usuarios hoy día, existen algunos factores que afectan la eficiencia y performance de PIVE.

Entre los más importantes que podemos mencionar figuran el estatus fisiológico de la donante, la raza, la utilización de protocolos de sincronización y estimulación ovárica, el esquema de recuperación de ovocitos, semen (convencional,

Fig. 1: Porcentaje de éxito en cada paso de PIVE



sexado), medios (maduración, fertilización y cultivo) y el protocolo general de trabajo e incubación. La falta de conocimiento y de control sobre estos factores incide en: 1) la calidad de ovocitos recuperados, 2) la tasa de fertilización y de desarrollo embrionario, 3) la calidad y congelabilidad del embrión, 4) la tasa de implantación/concepción y 5) la normalidad de la cría.

Se han logrado importantes progresos y avances en varias de estas áreas, como el aumento de la calidad de los ovocitos y embriones, y la drástica reducción de anomalías por crías pesadas^{1,4,8,32,35,36,37,38,42,44,50,51,58,63,64}. Hacia el futuro, lo más prometedor en términos de investigación y desarrollo se visualizaría en el campo de la estimulación folicular mediante FSH recombinante bovina, la cual, además de la especificidad, tendría otras ventajas, tales como potencia y persistencia²⁶. La otra área de avance estaría ligada al desarrollo de nuevas plataformas de incubación que imiten el ambiente y las condiciones donde suceden los eventos de maduración, fertilización y cultivo en la hembra^{59,60,61,69}.

Semen sexado: conociendo la tecnología

Una de las biotecnologías reproductivas más procuradas de todos los tiempos, "la selección del sexo antes del nacimiento", revela una historia de mucho optimismo, pero también de mucha frustración. En gran parte, esto se debió a la falta de entendimiento de los principios básicos que gobiernan la determinación del sexo en los mamíferos^{18,30,54,56}. Estos últimos están regidos por las leyes de las probabilidades. Para hacerlo más gráfico, podría decirse que no es nada raro escuchar comentarios de productores que refieren el nacimiento de diez terneros machos consecutivos en sus rodeos. Lo cierto es que si la

posibilidad de obtener un sexo u otro es 50:50, la factibilidad de que ocurra un caso como el mencionado arriba es 1:1024.

En la actualidad, existen dos formas de poder seleccionar el sexo de las crías antes del nacimiento:

- Sexado de embriones
- Sexado de semen

La primera, si bien es una técnica confiable (>90% de certeza), requiere la toma de biopsias de los embriones en estadios determinados previamente, producidos y recuperados de hembras donantes (colecta de embriones) o PIVE. La biopsia debe realizarse antes de su implantación y/o congelamiento. Este procedimiento provoca cierta pérdida de viabilidad del embrión por la manipulación extra a la que es sometido, lo que reduce la tasa de implantación. A este daño colateral debe sumarse el costo extra por la pérdida de concepción y descarte de los embriones del sexo no deseado.

Lo mencionado en el párrafo anterior apunta al sexado de semen como una alternativa más económica. En las especies mamíferas, los machos producen semen con 50% de espermatozoides que contienen el haplotipo X (hembra) del cromosoma sexual y 50% que contiene el haplotipo Y (macho).

Muchas diferencias hipotéticas propuestas entre los espermatozoides X e Y generaron más de una docena de métodos para sexar semen⁵⁶ y más de cien patentes en torno a este tema¹⁷. A pesar de ello, solamente una, el sexado de semen por citometría de flujo³⁰, logró alcanzar este objetivo con elevada efectividad.

Sexado de semen por citometría de flujo

Esta se basa en el contenido de ADN (material genético) de los cromosomas sexuales X e Y. Entre ambos

haplotipos existe una diferencia que, si bien es común a todos los mamíferos, varía en magnitud según la especie; en el bovino es aproximadamente del 4% mayor para el cromosoma X comparado con el Y.

Cuando se tiñe el ADN espermático con un colorante específico, que es excitado por una luz ultravioleta emitida por un rayo láser, este generará una fluorescencia que será 4% mayor para el espermatozoide que contiene el cromosoma X comparado con su contraparte Y. Este proceso, aunque muy lento (con los equipamientos actuales pueden producirse unas 6-8 dosis inseminantes por hora), presenta una eficacia promedio de 90% en la separación de los espermatozoides.

Aunque hayan pasado casi veinte años desde el primer reporte de mamíferos nacidos vivos por esta técnica²⁹, no fue sino hasta el año 2000 en que la tecnología se lanzó comercialmente. De todas maneras, podría afirmarse que recién a partir del año 2004/5, cuando los grandes centros de inseminación artificial del mundo (Select Sires, ABS, Genex, Semex, etc.) comenzaron a incorporar también la tecnología, el SS empezó a consolidarse como una herramienta biotecnológica. Esto fue consecuencia del mejoramiento en parte de los equipamientos y de la técnica de sexado, y también del mayor entendimiento sobre el uso correcto del producto.

Aplicaciones del semen sexado

La implementación del SS en combinación con otras biotecnologías reproductivas potencia sus beneficios y, a la vez, ayuda a diluir sus costos al obtener el "producto" que necesita (ya sea más hembras o machos) con mayor valor agregado. Entre los posibles usos del SS pueden citarse los siguientes:

- Inseminación artificial (IA): en la actualidad, el producto sexado (dos

millones de espermatozoides totales por pajueta) que se ofrece comercialmente es recomendado únicamente para uso en vaquillonas vírgenes a celo detectado. En sistemas con elevados estándares en nutrición, sanidad y manejo son esperables niveles de eficiencia de entre 70-90% de la tasa de concepción lograda con el mismo semen no sexado. La utilización en vacas en lactación ha arrojado resultados inconsistentes, y su aplicación estaría supeditada a una rigurosa selección de los animales, basada en su historial reproductivo.

- Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF): los resultados de ensayos que combinan el SS con programas de IATF son aún muy inconsistentes. Recientemente se han publicado algunos trabajos con resultados alentadores^{12,52}. A pesar de ello, el tema está aún en investigación, por lo que la recomendación sigue siendo

una eficaz detección de celos en los rodeos donde se pretenda utilizar el SS.

- Programas de superovulación y TE: si bien los primeros resultados de ensayos publicados en la literatura han sido algo erráticos, cada vez son más frecuentes los reportes de resultados satisfactorios y consistentes de su uso en condiciones comerciales. Su aplicación implicaría el uso de dosis de SS con concentraciones más elevadas (al menos 5-10 millones por pajueta), las cuales no están disponibles en el mercado, al menos de manera permanente.

- Producción in vitro de embriones (PIVE): debido a que la fertilización se realiza en un microambiente sumamente reducido (<50 µl), se requiere una muy poca cantidad de espermatozoides para ser cocultivados con los ovocitos recuperados. Esta alta eficiencia en la utilización del semen

favoreció la incorporación y puesta a punto del SS en PIVE. Primero se comenzó utilizando el SS disponible comercialmente, proveniente de los centros de inseminación artificial. Luego se desarrolló el procedimiento para sexar semen congelado convencional (comúnmente llamado SS revertido-SSR); se logró así un significativo avance en la adopción de la técnica por parte de los ganaderos. A los fines de entender mejor el procedimiento de SSR, la **Tabla I** marca las diferencias y similitudes entre SSR y el SS convencional (SSC). Este hecho, el poder sexar casi cualquier semen congelado, marcó un antes y un después en la adopción comercial de la PIVE. El SS revertido puede ser utilizado únicamente en PIVE debido a la poca cantidad de espermatozoides sexados recuperados¹³.

Tabla I.

Diferencias y similitudes entre semen sexado revertido (SSR) y semen sexado convencional (SSC).

	SSR	SSC
Origen del semen	Pajuelas congeladas	Semen fresco colectado de toros
Procedimiento de sexado	Citometría de flujo	Citometría de flujo
Producto final	Semen sexado fresco	Semen sexado congelado en pajuelas
Destino final principal	PIVE	IA

IA: inseminación artificial; PIVE: producción in vitro de embriones.

Impacto del semen sexado en el establecimiento lechero

- Impacto financiero (inversión inicial)

El costo de una pajueta sexada es de 2-4 veces más que el de una no sexada. Usualmente, este factor acaba siendo uno de los principales frenos para el uso masivo de esta tecnología. A pesar de ello, debe considerarse que, históricamente, la incidencia del costo del semen (convencional) en el costo total del tambo es muy baja (inferior al 2%). Si bien el uso del SS no implica mayores modificaciones en las técnicas de descongelación e inseminación utilizadas normalmente en la IA convencional, sí exige que todas ellas se lleven a cabo con mucha precisión y cuidado. También requiere un ajuste de todas las variables que puedan

alterar la performance reproductiva de las vaquillonas (eficacia en detección de celos, adecuada selección por aptitud reproductiva de las hembras por inseminar, etc.). Esto último podría generar algunos costos extras (por ejemplo, el pago de incentivos al personal que detecta celo e insemina, tacto pre-servicio, etc.).

El retorno de la inversión va a estar condicionado por varios factores, entre ellos pueden mencionarse algunos:

- Parámetros /índices reproductivos del establecimiento (principalmente, la tasa de detección de celo y concepción).
- Valor diferencial entre un ternero macho y uno hembra.
- Fertilidad del semen.

- Mérito genético del toro.
- Selección de hembras para inseminar (aptitud reproductiva, condición corporal, edad, peso, balance energético, ganancia diaria de peso, estatus sanitario, etc.).

Los beneficios asociados al uso de SS son económicamente importantes y deberían ser considerados también a la hora de la toma de decisiones. Esta no debería simplificarse a menor fertilidad y generación de más hembras. La utilización de SS dentro de un programa reproductivo presenta varias ventajas, entre las que pueden mencionarse: crecer en escala con recursos propios, evitar importar enfermedades al establecimiento (bioseguridad), cubrir la reposición al mejorar el control financiero asociado

a la compra de reemplazos, mayor tasa de hembras y la facilidad de parto, que conduce a más partos totales (hasta +15 puntos porcentuales), mayor fertilidad de vaquillonas de primer parto que fueron inseminadas con SS, menores complicaciones al parto significa más leche, reducir los índices de distocia (menos machos), mayor control y poder de selección de las hembras de descarte, aumentar la presión de selección al contar con más hembras acelerando el progreso genético.

▪ Impacto genético

Sin el uso del SS, el 90-92% del mejoramiento genético de un rodeo se debe a la selección del toro³. Con el uso del SS se espera que la incidencia de las hembras en el mejoramiento genético del rodeo sea del 15%. Esto se explicaría por una mayor capacidad de selección debido al incremento en el número de hembras logradas por período de tiempo²⁷. También se explicaría por la mayor disponibilidad de hembras de reemplazo como consecuencia del uso de SS y de la mayor posibilidad de selección sobre estas. Algo que resulta bastante difícil en rodeos lecheros promedio, que presentan una tasa de reemplazo anual superior al 25% y que no utilizan esta tecnología.

Complementación entre PIVE y semen sexado

Podría afirmarse que si bien el SS, tal cual el producto que se comercializa en la actualidad, logró el objetivo inicial de poder obtener crías de un solo sexo, aún dista bastante de ser lo que se idealizó desde su utilización.

Es decir, un producto que no afectara las tasas de concepción y cuyo valor pudiera permitir su uso masivo.

Existe muy poca información publicada, y en gran medida desactualizada, sobre avances en el uso de SS en PIVE. Hoy los laboratorios PIVE utilizan SS en condiciones similares al semen convencional. Esto produjo resultados pobres en muchos casos y fijó la idea de que el SS arroja una eficiencia <70% en relación con el semen control no sexado^{40,68,71,74}.

Esta diferencia en eficiencia entre el SS y su homólogo no sexado es muy similar tanto para PIVE como para IA. En el caso de PIVE, se habla de desarrollo embrionario al día 7 de cultivo sobre el total de ovocitos puestos a madurar. El mayor obstáculo para el SS para alcanzar tasas de penetración más altas es la baja fertilidad en comparación con el semen no sexado⁵⁵. Esta situación no pudo revertirse aumentando el número de espermatozoides por pajueta en vacas lactantes y fue variable en vaquillonas¹⁴. Las posibles causas de esta disminuida fertilidad serían menor sobrevivida posdescongelación, baja motilidad espermática, precapacitación e integridad acrosómica^{17,18,40,41,49,53}.

A esto se le podría sumar la inconsistencia en los resultados en vacas lecheras lactantes y la dificultad de implementar programas de inseminación a tiempo fijo.

Cabe remarcar que en muy pocos casos el SS recibió un trato justo a la hora de ser evaluado en las publicaciones. Pocos reportes han sido lo suficientemente rigurosos para comparar SS vs. convencional del mismo eyaculado/partida y de diversos toros. Cuando los experimentos fueron planteados de esta forma, la

performance del SS fue comparable a la del homólogo convencional. Esto es, fertilidad reducida (75-85% del control) y variaciones entre toros similares a lo que estamos habituados a encontrar en las publicaciones y a campo^{40,41,72}.

El planteo sobre la asociación entre la producción in vitro de embriones (PIVE) y el semen sexado (SS) radica en:

- PIVE logra una alta eficiencia en el uso del semen al fertilizar en microgotas (son requeridos pocos espermatozoides para fertilizar una gran cantidad de ovocitos).
- El SS contiene muy pocos espermatozoides por pajueta, y su valor es sustancialmente más elevado que la pajueta convencional (no sexada).

Esta complementación entre estas dos herramientas reproductivas resulta extremadamente interesante al permitir el uso eficiente del SS aprovechando las ventajas comparativas de la PIVE. Para presentar esta asociación, se propone a continuación una serie de tablas que ilustran comparaciones entre producción in vivo de embriones (MOET) a través de la superovulación y colecta de embriones tradicional, y la PIVE (**Tablas II, III y IV**).

Cabe aclarar que dicha comparación no pretende aseverar que una herramienta es mejor que la otra. Cada una presenta sus ventajas y desventajas, y el conocimiento cabal de ellas permite al profesional asesor determinar y decidir su aplicación en los rodeos.

Tabla II.

Superovulación y colecta de embriones convencional vs. producción in vitro de embriones con semen convencional (no sexado).

Parámetros	MOET	PIVE
Colectas por año	6 ^a	24 ^b
Embriones por colecta	6	4,5
Producción anual de embriones	36	108
Tasa de preñez	65% ^c	45% ^c
Total gestaciones producidas	23	49

^a Colecta cada 60 días; ^b 2 aspiraciones/mes; ^c Embriones transferidos frescos.

MOET: superovulación y colecta de embriones convencional; PIVE: producción in vitro de embriones.

Tabla III.

Superovulación y colecta de embriones convencional vs. producción in vitro de embriones con semen sexado.

Parámetros	MOET	PIVE + semen sexado
Colectas por año	6 ^a	24 ^b
Embriones por colecta	6	3
Producción anual de embriones	36	60
Relación de sexo (hembras:machos)	50:50%	90:10%
Tasa de preñez	65% ^c	45% ^c
Total gestaciones producidas/ hembra	12	29

^a Colecta cada 60 días; ^b 2 aspiraciones/mes; ^c Embriones transferidos frescos.

MOET: superovulación y colecta de embriones convencional; PIVE: producción in vitro de embriones.

Tabla IV.

Superovulación y colecta de embriones convencional vs. producción in vitro de embriones en vacas en lactancia.

Estado de la lactación	MOET	PIVE + semen sexado
10 a 45 días en lactancia	0	4
46 a 70 días en lactancia	5	4
70 a 110 días en lactancia (termina período de espera voluntario y comienza el período de servicios)	0	0
111 a 276 días en lactancia (preñada)	0	6
Total gestaciones producidas/ hembra	2	6

MOET: superovulación y colecta de embriones convencional; PIVE: producción in vitro de embriones.

Conclusiones finales

Durante los últimos 60-70 años, las biotecnologías reproductivas han constituido un modelo ejemplar de innovación y transferencia de tecnología entre los centros de investigación y el productor ganadero

en todo el mundo. El objetivo fue siempre acompañar el progreso genético acelerando la introducción de caracteres valiosos en los rodeos de carne y de leche. Hoy la oferta de herramientas reproductivas es muy amplia. El productor ganadero cuenta con la posibilidad de elegir, junto con

su asesor profesional, la técnica que mejor se ajuste a sus necesidades. La multiplicación de reproductores preseleccionados continúa siendo la misión fundamental de la reproducción animal, buscando mejorar la relación costo/beneficio.

Bibliografía

1. **Assumpção MEOA, Milazzotto MP, Simões R, Nicacio AC, Mendes CM, Mello MRB, et al.** In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Anim Reprod* 2008; 5:116-120.
2. **Bavister BD.** Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 2002; 124:181-196.
3. **Berglund B.** Genetic Improvement of Dairy Cow Reproductive Performance. *Reprod Dom Anim* 2008; 43:89-95.
4. **Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA.** Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002; 66:38-43
5. **Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J.** In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 1998; 51:59-70.
6. **Brckett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA.** Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982; 27:147-158.
7. **Britt JH, Cox NM, Stevenson JS.** Advances in reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1981; 64:1378-1402.
8. **Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S.** Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology* 2012; 78:1294-1302.
9. **Carolan C, Monaghan P, Mehmood A, Lonergan P, Gallagher M, Gordon I.** Slicing of bovine ovaries as a means of oocyte recovery. *J Reprod Fertil* 1992; 9:51(Abstr).
10. **Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PE, Rezamand P, et al.** 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology* 2007; 67:719-728.
11. **Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PE, et al.** Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 2006; 65:1631-1648.
12. **Crichton E, Huffman S, McSweeney K, Schenk J.** Artificial insemination of lactating holstein cows with sexed sperm. *Reproduction, Fertility and Development* 2006; 18:281.
13. **De Graaf SP, Evans G, Maxwell WMC, Cran DG, O'Brien JK.** Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 67:391-398.
14. **DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW.** Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 2008; 91:1778-1785.
15. **DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE.** Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 2009; 71:49-58.
16. **Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, et al.** Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003; 59:599-616.
17. **Garner DL, Seidel GE Jr.** History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 2008; 69:886-895.
18. **Garner DL.** Sex-Sorting Mammalian Sperm: Concept to Application in Animals. *Journal of Andrology* 2001; 22:519-526.
19. **Gordon I, Lu KH.** Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 1990; 33:77-87.
20. **Gordon I.** In Vitro Fertilization. En: Gordon I (eds). *Laboratory production of cattle embryos*. 2nd ed. Inglaterra, CABI Publishing, 2003; 176-219.
21. **Gordon I.** Recovering the Bovine Oocyte. En: Gordon I (eds). *Laboratory production of cattle embryos*. 2nd ed. Inglaterra, CABI Publishing 2003; 79-111.
22. **Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi, Ogawa K.** Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J Reprod Fert* 1988; 83:753-758.
23. **Hansen PJ.** Current Status and Applications of New Embryo Technologies in Dairy Herd Management. *WCDS Advances in Dairy Technology* 2007; 19:217-226.
24. **Hansen PJ.** Realizing the promise of IVF in cattle-an overview. *Theriogenology* 2006; 65:119-125.
25. **Hasler JF.** The Current Status of Oocyte Recovery, In Vitro Embryo Production, and Embryo Transfer in Domestic Animals, with an Emphasis on the Bovine. *J Anim Sci* 1998; 76:52-74.
26. **Hesser MW, Morris JC, Gibbons JR.** Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation. *Reproduction in Domestic Animals* 2011; 46:933-942.
27. **Hohenboken WD.** Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology* 1999; 52:1421-1433.
28. **Hoshi H.** In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 2003; 59:675-685.
29. **Johnson LA, Flook JP, Hawk HW.** Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 1989; 41:199-203.
30. **Johnson LA.** Separation of X and Y chromosome bearing sperm based on DNA differences. *Reproduction, Fertility and Development* 1995; 7:893-903.
31. **Johnson LA.** Sexing mammalian sperm for production of offspring: The state-of-the-art. *Animal Reproduction Science* 2000; 60-61:93-107.
32. **Krisher RL.** The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004; 82:E14-E23.
33. **Lauderdale JW.** Contributions in the Journal of Animal Science to the development of protocols for breeding management of cattle through synchronization of estrus and ovulation. *J Anim Sci* 2009; 87:801-812.
34. **Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL.** Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 1987; 36:376-83.
35. **Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, et al.** Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Anim Reprod Sci* 2008; 103:239-248.
36. **Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC.** Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 2006; 65:137-152.
37. **Lonergan P, Fair T.** In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 2008; 69:17-22.

- 38. Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP.** Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2001; 41:427-437.
- 39. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL.** Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 1994; 41:67-72.
- 40. Lu KH, Cran DG, Seidel Jr GE.** In vitro fertilization with flow-cytometrically sorted bovine sperm. *Theriogenology* 1999; 52:1393-1405.
- 41. Lu KH, Seidel Jr GE.** Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow-cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 2004; 62:819-830.
- 42. Merton JS, De Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, et al.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003; 59:651-674.
- 43. Mogas T, Martino A, Palomo MJ, Paramio MT.** Effect of method of recovery on the number and type of oocytes obtained for IVF. *J Reprod Fertil* 1992; 9:53 (Abstr).
- 44. Nivet AL, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, et al.** FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 2012; 143:165-171.
- 45. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL.** Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591-600.
- 46. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA.** Aspiration of bovine oocytes during trans-vaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988; 30:751-762.
- 47. Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164:666.
- 48. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC.** Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44:915-923.
- 49. Rath D, Johnson LA.** Application and Commercialization of Flow Cytometrically Sex-Sorted Semen. *Reprod Dom Anim* 2008; 43:338-346.
- 50. Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A.** Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim* 2008; 43:44-50.
- 51. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:234-248.
- 52. Schenk JL, Seidel GE.** Timed insemination of heifers with sexed sperm. *Reproduction, Fertility and Development* 2008; 20:214.
- 53. Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel Jr GE.** Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 52:1375-1391.
- 54. Seidel GE Jr, Garner DL.** Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2002; 124:733-743.
- 55. Seidel GE Jr, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, et al.** Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 1999; 52:1407-1420.
- 56. Seidel GE Jr.** Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 2003; 59:585-598.
- 57. Seidel GE Jr.** Sexing mammalian spermatozoa and embryos - State of the art. *J Reprod Fert* 1999; 54:475-485.
- 58. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C.** Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006; 65:126-136.
- 59. Smith GD, Takayama S, Swain JE.** Rethinking in vitro embryo culture: new developments in culture platforms and potential to improve assisted reproductive technologies. *Biol Reprod* 2012; 86:1-10.
- 60. Suh RS, Phadke N, Ohi DA, Takayama S, Smith GD.** Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics. *Hum Reprod Update* 2003; 9:451-461.
- 61. Swain JE, Smith GD.** Advances in embryo culture platforms: novel approaches to improve preimplantation embryo development through modifications of the microenvironment. *Hum Reprod Update* 2011; 17:541-557.
- 62. Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J.** Differences in development of bovine oocyte recovered by aspiration or by mincing. *J Ani Sci* 1992; 70:1923-1927.
- 63. Thompson JG, Peterson AJ.** Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Human Reproduction* 2000; 15:59-67.
- 64. Vajta G.** Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:357-364.
- 65. Wang Z, Yu S, Xu Z.** Effects of Collection Methods on Recovery Efficiency, Maturation Rate and Subsequent Embryonic Developmental Competence of Oocytes in Holstein Cow. *Asian-Aust J AnimSci* 2007; 20:496-500.
- 66. Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP.** Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 2000; 54:433-446.
- 67. Welch GR, Johnson LA.** Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* 1999; 52:1343-1352.
- 68. Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, IVanEtten T, Malusky S, Beebe DJ.** Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology* 2006; 65:219-227.
- 69. Wheeler MB, Walters EM, Beebe DJ.** Toward culture of single gametes: the development of microfluidic platforms for assisted reproduction. *Theriogenology* 2007; 68:178-189.
- 70. Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ.** Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 1951; 113:247.
- 71. Wilson RD, Fricke PM, Leibfried-Rutledge ML, Rutledge JJ, Penfield CM, Weigel KA.** In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2006; 65:1007-1015.
- 72. Wilson RD, Weigel KA, Fricke PM, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Matthews DL, et al.** In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *J Dairy Sci* 2005; 88:776-782.
- 73. Wiltbank JN.** Research needs in beef cattle reproduction. *J Anim Sci* 1970; 31:755-762.
- 74. Zhang M, Lu KH, Seidel GE Jr.** Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology* 2003; 60:1657-1663.