



Sexaje de semen equino: estado actual de la técnica

INTRODUCCIÓN

La selección del sexo de la descendencia siempre ha tenido gran interés en ganadería. Hacia el siglo V antes de Cristo, el filósofo griego Anaxágoras, propuso que los espermatozoides provenientes del testículo izquierdo daban lugar a hembras y los del derecho a machos, idea que se mantuvo hasta bien entrado el siglo XVIII. Esta creencia dio lugar a ideas como la castración unilateral, o la presión de un testículo en el momento de la eyaculación como métodos de elegir el sexo de la descendencia. El descubrimiento de los cromosomas sexuales a principios del siglo XX (X e Y), y el descubrimiento que los espermatozoides portan uno u otro cromosoma, en los años 70 del siglo pasado, sentaron las bases de la selección del sexo.

En el ganado vacuno de leche la reposición de la explotaciones se facilita obteniendo un mayor número de hembras, en la industria porcina las hembras se prefieren

debido a los problemas de la carne de machos (olor). En programas de recuperación de razas o especies en peligro de extinción es esencial disponer de un gran número de hembras. En medicina humana se emplea el diagnóstico pre-implantacional del sexo del embrión para el control de enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales; en este caso el sexaje del semen evitaría la destrucción de un gran número de embriones no implantados.

La técnica del sexaje de semen ya ha alcanzado la fase comercial de explotación en toros y multitud de dosis de semen sexado se venden anualmente. En caballos, la especie que nos ocupa, la técnica está muy poco desarrollada, debido a la falta de fondos para investigación en reproducción equina. Sin embargo, ya se han producido nacimientos tras inseminaciones con semen sexado. La primera potra nació en el año 2000 en Estados Unidos, y desde entonces han nacido potros con esta técnica en los Estados Unidos, Argentina, Australia

e Italia. Algunos ejemplos pueden indicar el interés de la selección del sexo en caballos, la disciplina de Polo a favor de las hembras, o la Doma y el Raid a favor de los machos. Recientemente el grupo de reproducción equina de la Universidad de Extremadura ha recibido financiación competitiva de los **Gobiernos de España (AGL 2010-20758) y Extremadura (PCE 1002)** para investigar en el tema.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

El sexo de la descendencia depende del gameto masculino, el espermatozoide. El gameto femenino, el ovocito, siempre porta el cromosoma X.

El proceso de sexaje es muy complejo y se basa en la diferencia en contenido de ADN entre los espermatozoides portadores del cromosoma X, que darán lugar a hembras, e Y, que darán lugar a



machos. En promedio la diferencia ronda el 4% a favor de los portadores del X. El primer paso en el proceso de sexaje es **identificar el cromosoma** que porta cada espermatozoide. Para ello se usa un colorante específico que tiñe el ADN denominado Hoechst 33342. Esta molécula se une a **la curvatura mayor de la doble hélice del ADN**, especialmente en regiones ricas en **Adenina y Timina**. Al no intercalarse entre los pares de bases nitrogenadas no tiene efecto mutagénico. La incubación con la sonda en el caso del semen equino requiere tiempos de **al menos 90 minutos** para obtener buena discriminación entre ambas poblaciones de espermatozoides. Un problema específico en el caso del equino, es la turbidez de los diluyentes habitualmente usados que dificulta la discrimi-

nación entre ambas poblaciones. Uno de los primeros avances en la técnica que ha permitido la investigación en la **Universidad de Extremadura**, ha sido el diseño de diluyentes menos opacos que manteniendo la capacidad de conservar el semen, permitan mejorar la resolución. Otro de los problemas específicos del semen equino es su forma más ovalada y menos plana respecto al semen de toro. Este hecho también explica que la identificación de ambas poblaciones sea más problemática en el caballo respecto al toro.

Una vez teñidos, el segundo paso es introducirlos en el citómetro de flujo. El citómetro vehicula los espermatozoides alineados en un fluido envolvente, normalmente una solución salina tamponada (PBS) hacia lo que se denomina **punto de interrogación**. Aquí un laser ultravioleta incide sobre el espermatozoide excitando el Hoechst 33342 y por tanto el espermatozoide emite fluorescencia azul que es revelada en dos detectores; uno de ellos colocado en línea con el láser, lo que se denomina detector frontal (**FSC**) y otro en ángulo de 90° respecto a aquel, el denominado detector lateral (**SCC**). Estas señales luminosas son transformadas en señales eléctricas y el ordenador del equipo las convierte en los histogramas y diagramas de puntos que representan las poblaciones de espermatozoides. El software nos permite **visualizar en la pantalla del ordenador** los espermatozoides, y distinguir los vivos, y dentro de esta población los portadores del cromosoma X y los del

Y (**figura 1**), y por lo tanto seleccionarlos. Para distinguir los vivos, se añade al semen un colorante alimentario que bloquea la fluorescencia de los espermatozoides que tienen la membrana dañada.

Una vez identificados, se procede a su separación. Para ello el chorro del líquido que vehicula a los espermatozoides **se rompe en gotas**, en las que una vez identificado el cromosoma que porta, se encierra un espermatozoide. Para proceder a su separación a cada gota se le aplica **una carga eléctrica**, positiva o negativa, para que al llegar en chorro a unas **placas deflectoras**, cargadas de electricidad el chorro se desvíe hacia uno u otro lado, y así poder recoger en tubos independientes los espermatozoides portadores de cada uno de los cromosomas (**figura 2**).

DAÑOS AL ESPERMATOZOIDE DURANTE EL PROCESO DE SEXAJE

Todo este proceso supone una gran modificación de la fisiología del espermatozoide, hecho que determina que el **semen sexado necesite un manejo muy especial para su uso en inseminación**. Una de las líneas de trabajo en la Universidad de Extremadura es el estudio de los cambios que provoca el proceso de sexaje en el espermatozoide equino y el desarrollo de estrategias de mejora de la calidad de las dosis sexadas. Hemos podido identificar los cambios que el proceso de sexado origina en el espermatozoide, descubriendo

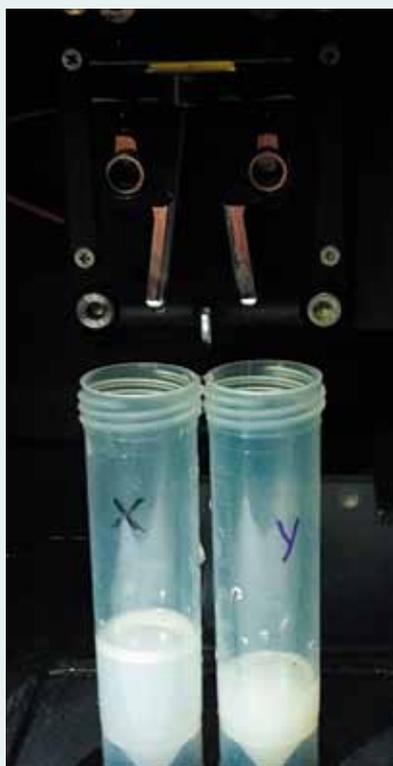


Figura 1. Identificación de la población de espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y.



que el **sexado incrementa la permeabilidad de la membrana** espermática, reduciendo en muchos casos el **estado energético** de esta célula. En otras ocasiones se observa un estado de **capacitación prematura**. Sin embargo, **estos cambios varían mucho entre sementales**.

ESTADO ACTUAL DE APLICACIÓN DE LA TÉCNICA

Si bien es necesaria mucha más investigación, la técnica esta en una estado muy avanzado para su uso con semen fresco y refrigerado. Sin embargo hay que entender muy bien que supone la técnica, tanto en lo que se refiere a las modificaciones que provoca al espermatozoide, como al relativamente bajo número de espermatozoides que se separan por hora y al hecho que la pureza de la separación no es del 100%. Todos estos condicionantes implican **la necesidad de una buena elección tanto del semental, al que se le va a sexar el semen, como de la yegua que se va a inseminar con el semen sexado**. Esta selección se ha de basar tanto en criterios genéticos, como reproductivos.

Criterios genéticos deben tenerse en cuenta debido a la complejidad del proceso de sexaje en sí mismo, y también de la necesidad de usar un método de inseminación no convencional. Todo esto

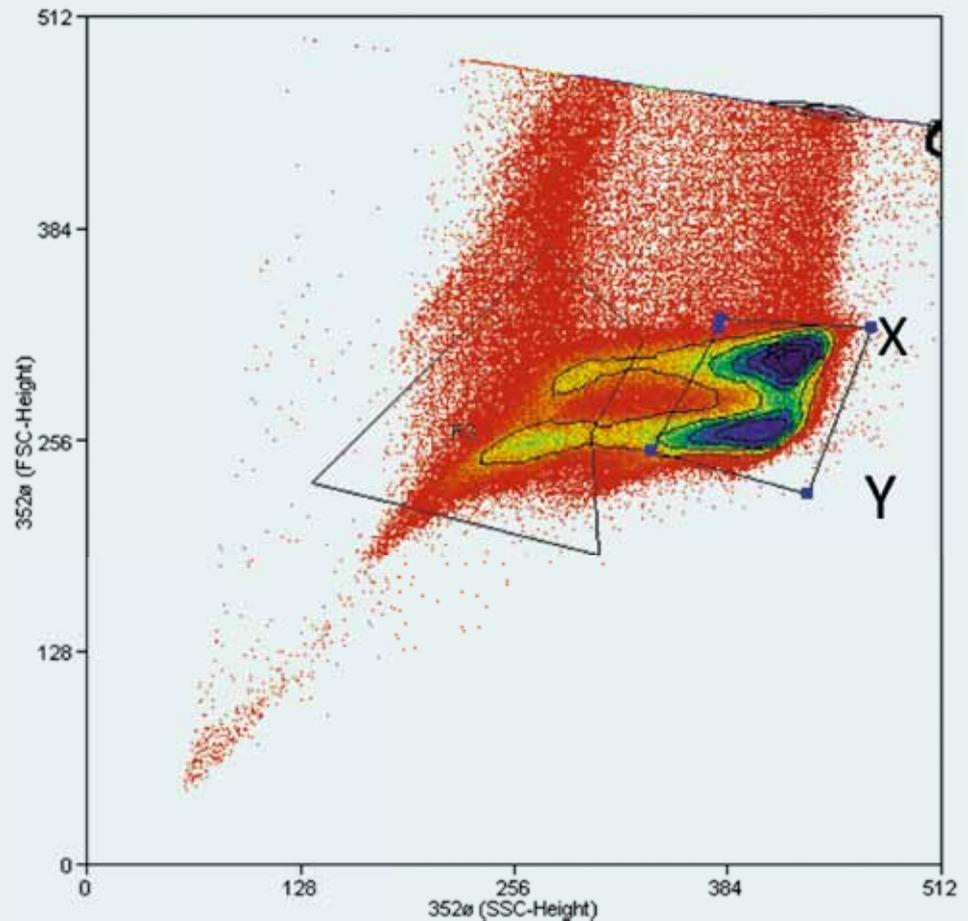


Figura 2. Recogida de los espermatozoides sexados.

determina que la técnica sea muy cara, y no sea viable a no ser que trabajemos con animales de alto valor que compensen el coste extra de la técnica.

Criterios reproductivos se han de tener en cuenta. En cuanto al semental es importante tener en cuenta la variabilidad existente, no solo en calidad seminal sino también en la “separabilidad” de sus espermatozoides. En muchos sementales es recomendable un procesado previo del semen mediante técnicas de centrifugación en doble gradiente. Respecto a la yegua idealmente hemos de buscar hembras con buena fertilidad. Yeguas de edad avanzada, con quistosis endometrial importante o tendentes a endometritis no sería buenas candidatas.

A pesar de todos estos factores podemos afirmar que **la inseminación con semen sexado en la yegua es ya una posibilidad real**, que con semen refrigerado esta ya casi a punto para ser ofertada de modo rutinario en el servicio de reproducción equina de la universidad de Extremadura. En estos momentos la investigación se dirige a la conservación a largo plazo del semen sexado, con el objetivo de poder introducir en el mercado la técnica de un modo similar a lo que ya esta ocurriendo en el ganado vacuno.

Por **Prof. Dr. Fernando J. Peña**
 fjuanpvega@unex.es
 Facultad de Veterinaria
 Universidad de Extremadura

